BAND 39, HEFT 3 SEPTEMBER 1960

PHYTOPATHOLOGISCHE ZEITSCHRIFT

Begründet von Prof. Dr. E. Schaffnit

Unter Mitwirkung von

Prof. Dr. E. Baldacci, Mailand / Prof. Dr. H. Braun, Bonn / Prof. Dr. W. B. Brierley, Keswick-Cumberland / Prof. Dr. N. Hiratsuka, Tokyo / Oberreg.-Rat i. R. Dr. E. Köhler, Braunschweig / Prof. Dr. K. O. Müller, Canberra / Prof. Dr. H. M. Quanjer, Wageningen / Prof. Dr. T. S. Sadasivan, Madras / Prof. Dr. Tr. Savulescu, Bukarest Prof. Dr. K. Silberschmidt, São Paulo / Prof. Dr. E. C. Stakman, St. Paul

herausgegeben von den Professoren

E. Gäumann Zürich

M. Klinkowski Aschersleben

H. Richter Berlin-Dahlem

Mit 51 Abbildungen

1960

PAUL PAREY IN BERLIN UND HAMBURG

Phytopath. Z. Bd. 39 **Heft 3** *S. 197—296 Berlin 1960*

Postverlagsort Berlin

NSP RAM MM

WEALTH MYCOLOGICAL 4 OCT 1960

INHALT

Abhandlungen

BRAUN, R., Über Wirkungsweise und Umwandlungen der Fusarinsäure. Mit 13 Abb. 197

KÖHLER, E., Über die Beeinflussung des Infektionserfolges an Blättern durch Virushemmstoffe. Mit 16 Abb. 242

LOPRIENO, N. e I. TENERINI, Indagini sul *Gloeosporium olivarum* Alm., agente dalla «lebbra» delle olive. Con 19 figure 262

MÜLLER, H. J., Über das Vorkommen von *Cryptosporiopsis corticola* (Edg.) Nannf. auf der Rinde von Apfel und Birne. Mit 3 Abb. 291

Manuskripte: In deutscher, englischer, französischer oder italienischer Sprache abgefaßte Originalarbeiten werden druckfertig und möglichst in Schreibmaschinenschrift erbeten. Aufnahme von Tabellen und Abbildungen unterliegt jeweils vorheriger Vereinbarung.
„Kurze Mitteilungen" sind solche Veröffentlichungen in den vorerwähnten Sprachen, die im nächsten Heft.
allgemeinen einen Umfang von vier Druckseiten nicht übersteigen. Sie erscheinen möglichst schon im Die „Besprechungen" erscheinen nur in deutscher Sprache.

Herausgeber: Prof. Dr. E. GÄUMANN, Zürich 6, Universitätsstraße 2, Prof. Dr. M. KLINKOWSKI, Aschersleben, Ermslebener Str. 52, und Prof. Dr. H. RICHTER, Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Str. 19. Zusendung der Manuskripte von Originalarbeiten und „Kurzen Mitteilungen" entweder an den Verlag Paul Parey, Berlin SW 61, Lindenstraße 44/47, oder an einen der drei Herausgeber.
Zusendung der „Besprechungen" unmittelbar an Prof. RICHTER, Berlin-Dahlem. Soweit nicht eine Aufforderung der Herausgeber zur Besprechung bestimmter Arbeiten ergangen ist, empfiehlt es sich, Prof. RICHTER vorher von der Absicht der Besprechung zu verständigen.

Honorierung: Das Mitarbeiterhonorar für Originalarbeiten und „Kurze Mitteilungen" beträgt 32,— DM je Druckbogen von 16 Seiten. Bei Beiträgen von mehr als drei Bogen werden nur die ersten drei Bogen honoriert; Dissertationen und Buchbesprechungen sind honorarfrei.

Sonderdrucke: Jeder Mitarbeiter erhält unberechnet 30 Sonderdrucke seines Beitrages (Originalarbeiten und Kurze Mitteilungen). Mehrbedarf gegen Berechnung.

Vorbehalt aller Rechte, insbesondere auch der photomechanischen Vervielfältigung: Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdrucks und der photomechanischen Wiedergabe sind vorbehalten. Gewerblichen Unternehmen wird die Anfertigung einer photomechanischen Vervielfältigung von Beiträgen oder Beitragsteilen für den innerbetrieblichen Gebrauch durch Photokopie, Mikrokopie und dergleichen, nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens vom 14. 6. 1958, gegen Bezahlung der dort vorgesehenen Gebühr bis zu 3 Exemplaren gestattet. Die Vervielfältigungen haben einen Vermerk über die Quelle und den Vervielfältiger zu tragen. Die in dem Rahmenabkommen vorgesehene Gebühr ist an die Inkassostelle für Photokopiergebühren beim Börsenverein des Deutschen Buchhandels e. V., Frankfurt/M., Gr. Hirschgraben 17-19, zu entrichten. Erfolgt die Entrichtung der Gebühren durch Wertmarken der Inkassostelle, so ist für jedes Photokopierblatt eine Marke im Werte von DM 0,30 zu verwenden. Mit der Überlassung des Manuskriptes überträgt der Verfasser dem Verlag das Recht zu dieser Genehmigung.

Erscheinungsweise: Die Zeitschrift erscheint in zwangloser Folge. Jährlich erscheinen etwa 10—12 Hefte, von denen 4 einen Band bilden. Jedes Heft enthält etwa 7 Druckbogen.

Bezugsbedingungen: Der Preis des Bandes richtet sich nach dem Umfang. Er beträgt je Druckbogen von 16 Seiten etwa 3,75 DM. Die Hefte sind auch einzeln käuflich. Das Abonnement verpflichtet zum Bezug eines ganzen Bandes. Es verlängert sich jeweils, falls nicht spätestens unverzüglich nach Eingang der letzten Lieferung des berechneten Bandes Abbestellung erfolgt.

Verlag: Paul Parey, Berlin SW 61, Lindenstraße 44/47, Telefon 61 44 68/69. Printed in Germany (Westberlin).

Abonnementspreis dieses Heftes 25,80 DM **Einzelpreis 28,40 DM**

Aus dem Institut für spezielle Botanik
der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich
Direktor: Prof. Dr. E. Gäumann

Über Wirkungsweise und Umwandlungen der Fusarinsäure[1])

Von

RICHARD BRAUN

Mit 13 Abbildungen

Inhalt: Einleitung. — 1. Kapitel. Methoden. — 2. Kapitel. Umwandlungen der Fusarinsäure in Tomatensprossen. — 3. Kapitel. Umwandlungen der Fusarinsäure in Homogenaten von Tomatenpflanzen. — 4. Kapitel. Umwandlungen der Fusarinsäure in Pilzkulturen. — 5. Kapitel. Wirkungen der Fusarinsäure. — Diskussion. — Zusammenfassung. — Summary. — Literaturverzeichnis.

EINLEITUNG

Verschiedene Erreger pflanzlicher Welkekrankheiten schädigen ihre Wirte in entscheidendem Maße dadurch, daß sie in ihnen Welketoxine bilden und ausscheiden. Auch für *Fusarium lycopersici* Sacc., das eine Welkekrankheit der Tomate verursacht, sind mehrere Welketoxine nachgewiesen worden: Fusarinsäure (GÄUMANN, NAEF-ROTH und KOBEL 1952), Dehydrofusarinsäure (STOLL, RENZ und GÄUMANN 1957), Lycomarasmin (GÄUMANN, NAEF-ROTH und MIESCHER 1950), Vasinfuscarin (GÄUMANN, STOLL und KERN 1953), Äthanol (SCHEFFER und WALKER 1953) und Äthylen (DIMOND und WAGGONER 1953). Jedes dieser Toxine löst in Tomatensprossen die Bildung charakteristischer Symptome aus.

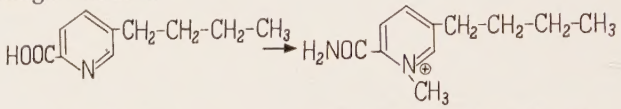
Von diesen Toxinen eignet sich Fusarinsäure vorzüglich zu Untersuchungen über die physiologischen Eingriffe von Welketoxinen, da sie stark wirksam, chemisch stabil und strukturell einfach gebaut ist. Die Fusarinsäure wurde erstmals von YABUTA, KAMBE und HAYASHI (1934) isoliert und als 5-n-Butyl-pyridin-2-carbonsäure erkannt. Diese Struk-

[1]) Die Arbeit wurde durch einen Beitrag der Fritz Hoffmann-La Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz ermöglicht. Ihrer Behörde sei auch an dieser Stelle unser Dank ausgesprochen.

tur wurde von PLATTNER, KELLER und BOLLER (1954) durch Synthese bestätigt. Fusarinsäure wird nicht nur durch *Fusarium lycopersici,* sondern auch durch andere Hypocreaceen gebildet (GÄUMANN 1957, PAGE 1959).

Das Wirkungsspektrum der Fusarinsäure ist sehr breit: das Toxin schädigt eine große Zahl von Phanerogamen, Pilzen, Grünalgen und Bakterien (GÄUMANN 1957). Die Wirkung ist pleiotrop, d. h. sie beruht auf einer Vielzahl verschiedenartiger Eingriffe in die Lebensvorgänge des in Frage stehenden Organismus. Neben Wirkungen der Fusarinsäure, welche im Bereiche physiologischer Toxinkonzentrationen wahrscheinlich von geringer Bedeutung sind, spielen die kompetitive Hemmung der Polyphenoloxydase (BOSSI 1959) und die Störung der Semipermeabilität (BACHMANN 1956, GÄUMANN und LOEFFLER 1957) eine entscheidende Rolle für das Zustandekommen einer Schädigung. Zudem vermag Fusarinsäure die Wirkung eines essentiellen Metaboliten verschiedener Pilze und Bakterien kompetitiv aufzuheben (KALYANASUNDARAM 1960). Zwischen der Fusarinsäure und dem bisher noch nicht identifizierten Metaboliten, vermutlich einer organischen Säure, scheint auch in Tomatenpflanzen eine Wechselwirkung zu bestehen.

In Tomatensprossen wird Fusarinsäure chemisch verändert. SANWAL (1956) und KLUEPFEL (1957) fanden unter bestimmten Versuchsbedingungen zwei Tage nach Applikation rund 10 % der verabreichten Fusarinsäure decarboxyliert, 20 % in das wenig giftige, lipophile Fusarinsäureamidchlormethylat und schließlich weitere 20 % in zwei nicht identifizierte hydrophile Stoffe („Neutralteil") umgewandelt. Die zweite Umwandlung ist eine echte Entgiftungsreaktion.



Fusarinsäure *Fusarinsäureamidchlormethylat*

Eine große Zahl von lipophilen Giftstoffen wird im tierischen Organismus durch Koppelung mit Glucuronsäure, Sulfationen usw. zu hydrophilen Stoffen umgewandelt und entgiftet (WILLIAMS 1949), während solche Reaktionen bei Pflanzen bisher nicht bekannt sind. Da es sich bei den hydrophilen Umwandlungsprodukten der Fusarinsäure um solche gekoppelte Giftstoffe handeln könnte, wurde versucht, die Frage nach der Natur dieser Stoffe zu klären.

Obwohl bereits verschiedene Untersuchungen über die Umwandlungen der Fusarinsäure in Tomatensprossen vorliegen, ist nicht bekannt, ob diejenigen Pilze, welche selbst Fusarinsäure bilden, das Toxin weiter umwandeln. Im folgenden werden Versuche beschrieben, die klären sollen, ob Fusarinsäure durch die sie synthetisierenden Pilze und auch durch andere Mikroorganismen chemisch verändert wird.

SANWAL (1956) vermutete einen Zusammenhang zwischen der Umwandlung und der Wirkung der Fusarinsäure in Tomatensprossen. Er stellte die Hypothese auf, daß aus Carboxyl-markierter Fusarinsäure unter Abspaltung von $^{14}CO_2$ Butylpyridin entstehe. Vom erwarteten Butylpyridin

konnte BACHMANN (1956) zeigen, daß es die Wasserpermeabilität pflanzlicher Protoplasten um ein Vielfaches stärker stört als Fusarinsäure selbst. Somit könnte die Decarboxylierung als eine „letale Synthese" (LEUTHARDT 1957) bezeichnet werden. Nachdem im Pyridinkern markierte Fusarinsäure zur Verfügung stand, wurde es möglich, die Hypothese, in Tomatensprossen entstehe Butylpyridin aus Fusarinsäure, experimentell zu prüfen.

Eine weitere Beziehung zwischen den Umwandlungen und Wirkungen der Fusarinsäure war im Zusammenhange mit dem von KALYANASUNDARAM (1960) beschriebenen Fusarinsäure-Antagonisten zu vermuten. Da kompetitive Antagonisten in der Regel ähnliche Strukturen besitzen und biochemische Umwandlungen fast ausnahmslos einstufig verlaufen, könnten mindestens die ersten Umwandlungsprodukte der Fusarinsäure die Wirkung des Ausgangsstoffes antagonisieren. Es wurde daher untersucht, ob Umwandlungsprodukte der Fusarinsäure oder strukturell nahestehende synthetische Stoffe die Wirkung des Toxines aufzuheben vermögen.

1. KAPITEL

METHODEN

1. Isotopentechnik

Von einer Ausnahme abgesehen war ^{14}C-Fusarinsäure die einzige in den vorliegenden Untersuchungen angewendete radioaktive Substanz. Von Herrn Prof. Dr. E. HARDEGGER und seinen Mitarbeitern[1]) wurden zwei Arten markierter Fusarinsäure synthetisiert: in einem Falle war das ^{14}C in die Carboxylgruppe eingebaut, im andern Falle enthielt die Stellung 2 des Pyridinkernes 75 % der Markierung, während der Rest der Markierung sich in Stellung 1 der Butylseitenkette befand. Der Einfachheit halber wird die zweite Fusarinsäure im folgenden als Kern-markiert bezeichnet. Die an sich unerwünschte doppelte Markierung kam dadurch zustande, daß während der Synthese eine nicht voraussehbare Umlagerung stattfand. Die spezifischen Aktivitäten betrugen: Carboxyl-Markierung 14 mC/mMol; Kern-Markierung 53 μC/mMol (HARDEGGER und NIKLES 1956, BILAND, LOHSE und HARDEGGER 1960).

a) Aktivitätsbestimmung

^{14}C ist ein energiearmer β-Strahler mit einer Halbwertszeit von 5600 Jahren und einer maximalen Energie von 0,155 MeV. Die lange Halbwertszeit führt dazu, daß die spezifische Aktivität auch bei einem hohen effektiven Gehalt an ^{14}C relativ gering ist. Aus der maximalen Energie berechnet sich die Halbwertsdicke zu 2,7 mg/cm^2 (FAIRES und PARKS 1958). Diese geringe Halbwertsdicke hat zur Folge, daß die Selbstabsorption einer Probe, welche

[1]) Den Herren Prof. Dr. E. HARDEGGER, Dr. E. NIKLES und H. BILAND vom Laboratorium für organische Chemie an der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich sei für ihre stete und wertvolle Unterstützung unser herzlicher Dank ausgesprochen.

je cm^2 mehrere mg Substanz enthält, zu einer wesentlichen Verfälschung des Meßresultates führt. Bei gleicher Geometrie der Proben kann die Selbstabsorption auf drei Arten kompensiert werden:

— Messung bei sehr dünner Schicht: bei 0,5 mg/cm^2 beträgt die Selbstabsorption weniger als 5 % und kann daher bei den meisten Problemstellungen vernachlässigt werden.

— Messung bei sehr dicker Schicht: die gemessene Aktivität hat einen maximalen Wert erreicht. Eine weitere Verdickung der Schicht hat keine Erhöhung der gemessenen Aktivität zur Folge. Bei einer Schichtdicke von über 20 mg/cm^2 ist die gemessene Aktivität daher ein Maß für die spezifische Aktivität (Aktivität je Gewichtseinheit Substanz).

— Bei Schichtdicken zwischen 0,5 und 20 mg/cm^2 muß die gemessene Aktivität mit einem Korrekturfaktor multipliziert werden. Wahlweise kann man entweder diejenige Aktivität berechnen, die man bei sehr dicker oder sehr dünner Schicht gemessen hätte. Die Faktoren werden experimentell erhalten, indem verschieden dicke Proben von Material mit gleicher spezifischer Aktivität ausgemessen werden.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde die Radioaktivität von $^{14}CO_2$ (als $Ba^{14}CO_3$) nach der dritten Methode bestimmt, während die übrigen Aktivitäten bei sehr dünner Schicht gemessen wurden.

Kohlendioxyd wurde in 20 ml 0,2 n Natronlauge aufgefangen. Die Lauge wurde mit der gleichen Menge einer äquimolaren Lösung von Ammonnitrat versetzt und 15 Minuten auf 90 °C erwärmt. Darauf wurden 10 ml Bariumlösung zugesetzt, und die Probe wurde nochmals in gleicher Weise erwärmt. 1 Liter Bariumlösung enthielt 800 ml einer gesättigten Bariumhydroxydlösung und 200 ml einer Lösung von 8,6 g Bariumchlorid je 100 ml (CALVIN, HEIDELBERGER, REID, TOLBERT und YANKWICH 1949). Das ausgeflockte Bariumkarbonat wurde abzentrifugiert, in Alkohol suspendiert und in runde Probeschalen von 21 mm Durchmesser und 8 mm Höhe übertragen. Nach dem Verdampfen des Alkohols bildete sich eine homogene Schicht von Bariumkarbonat. Alle Operationen mit Natronlauge wurden unter Luftabschluß durchgeführt.

Die übrigen Aktivitäten wurden direkt bestimmt: es wurden Probeschalen verwendet, welche den oben beschriebenen entsprachen, aber in der Mitte eine schwache Vertiefung von 12 mm Durchmesser aufwiesen, in welche ein Flüssigkeitstropfen gegeben wurde. Innerhalb des gleichen Versuches wurde die gleiche Menge Festsubstanz (meistens 0,5 mg) in der gleichen Menge des gleichen Lösungsmittels (meistens 0,1 ml Alkohol) in die Schalen gegeben. In fast allen Fällen wurde also bei sehr dünner Schicht gemessen; in den übrigen Fällen wurde ein relativer Wert erhalten, indem gleiche Mengen (z. B. 5 mg) von zwei Substanzen mit bekannter und unbekannter Aktivität ausgemessen wurden. Die angewendete Methode erwies sich als genau: beispielsweise streuten fünf Aktivitätsbestimmungen einer Fusarinsäurelösung nur um 3,4 %.

Die Aktivität von ^{14}C-Verbindungen wird häufig nach einer Verbrennung bestimmt, indem gasförmige Proben von $^{14}CO_2$ oder feste Proben von

$Ba^{14}CO_3$ hergestellt werden (Aronoff 1956, Sanwal 1956, Kluepfel 1957). Eigene Untersuchungen zeigten jedoch, daß die nasse Verbrennung nach Van Slyke (Van Slyke, Plazin und Weisiger 1951) für unsere Versuche aus zwei Gründen nicht geeignet ist:

— man benötigt relativ große Substanzmengen (5 bis 10 mg);

— im Gegensatz zu vielen anderen organischen Verbindungen wird Fusarinsäure nicht quantitativ verbrannt. Bei mehreren Modifikationen der Verbrennungsmethode war die Ausbeute an Bariumkarbonat bei Fusarinsäure gegenüber dem theoretischen Wert um 15 % zu tief, während der Vergleichswert für Benzoesäure mit dem theoretisch erwarteten Wert gut übereinstimmte.

Die Radioaktivität der Proben wurde mit einem abgeschirmten Endfensterzählrohr gemessen (EQB-1, Landis & Gyr, Zug). Das Fenster besitzt einen Durchmesser von 25 mm und ein Flächengewicht von 2 bis 3 mg/cm².

Jeder gemessene Wert wurde bezüglich Blindwert (background) und eventueller Selbstabsorption und Totzeit korrigiert. Die Sicherung der gemessenen Werte erfolgte auf zwei Arten:

— Herstellung von mehreren Proben des gleichen Materials und Berechnung des Mittelwertes und der Streuung;

— Herstellung einer einzigen Probe und Berechnung derjenigen Streuung, innerhalb welcher $^9/_{10}$ der weiteren gemessenen Werte erwartet werden können. Diese Streuung wird erhalten, indem die Wurzel aus der Anzahl gemessener Impulse mit dem Faktor 1,65 multipliziert wird (Aronoff 1956). Die Meßzeit wurde entsprechend der gewünschten statistischen Sicherheit gewählt und lag in der Regel zwischen 5 und 30 Minuten.

b) Radioautographie

Auf Papierchromatogrammen können radioaktive Substanzen leicht und genau mit Hilfe der Radioautographie lokalisiert werden. Hierbei wird ein hochempfindlicher photographischer Film der Strahlung der im Papierchromatogramm enthaltenen Radioisotopen ausgesetzt. In unseren Versuchen wurden das gut getrocknete Papierchromatogramm und ein Agfa-Sino-Röntgen-Film während längerer Zeit in engen Kontakt gebracht. Der Film wurde bei olivgrünem Licht (Ilford Filter X 905) in Agfa-Röntgen-Rapid-Entwickler Nr. 56 während 5 Minuten bei 20 °C entwickelt. Nach einer sauren Zwischenwässerung wurde 10 Minuten in saurem Agfa-Röntgen-Fixierbad fixiert.

Die Expositionszeiten der Filme wurden experimentell festgelegt und lagen meistens zwischen 1 und 14 Tagen.

Die Methode der Radioautographie war vor allem dann sehr geeignet, wenn es galt, eine Vielzahl von Umwandlungsprodukten der Fusarinsäure bei Versuchsende nachzuweisen. Galt es hingegen, einen bestimmten Stoff während einer mikrobiellen Umsetzung nachzuweisen, so war die Methode zu langsam. In diesem Falle wurden die Papierchromatogramme als Radiochromatogramme mit dem Geigerzähler ausgewertet.

c) Radiochromatogramme

Die Radiochromatogramme wurden in 5 cm breite Längsstreifen geschnitten und schrittweise mit Hilfe eines einfachen Apparates unter dem Zählrohr durchgezogen (SANWAL 1956). Zwischen dem Zählrohr und dem Papierstreifen befand sich eine Maske mit einer Öffnung von 20 mm Breite und 4 bzw. 10 mm Länge. Je nach der gewünschten Genauigkeit und der im Papier vorhandenen Radioaktivität wurde die eine oder andere Maske benutzt. Auf diese Weise wurde die Radioaktivität an jeder Stelle des Papierchromatogrammes gemessen. Die Maxima der Verteilungskurve ergeben die R_f-Werte der markierten Substanzen.

Auf Grund der folgenden Überlegungen kann man entscheiden, ob es sinnvoller ist, ein Papierchromatogramm, welches radioaktive Substanzen enthält, mit Hilfe eines Zählers oder eines Filmes auszuwerten. Um eine brauchbare Schwärzung zu erhalten, müssen je cm^2 $2 \cdot 10^7$ Elektronen auf den Film auftreffen (FAIRES und PARKS 1958). Mit dem Geigerzähler kann eine Aktivität, welche den Blindwert von 20 Imp./Min. verdoppelt, mit guter Sicherheit in 10 Minuten festgestellt werden. Bei einer Fensteröffnung des Zählers von 5 cm^2 und einer effektiven Zählerempfindlichkeit von 2 % entspricht dies einer Aktivität von $2 \cdot 10^2$ Imp./Min. cm^2. Ein Film müßte bei dieser Aktivität somit 10^5 Minuten oder 70 Tage exponiert werden. Daraus ergibt sich, daß die Radioautographie nur dann angewendet werden kann, wenn die eingesetzten Aktivitäten hoch sind oder wenn Resultate nicht in kurzer Zeit zur Verfügung stehen müssen.

Die Radiochromatographie erlaubt nicht nur eine raschere und empfindlichere Auswertung von Papierchromatogrammen als die Radioautographie, sondern sie gestattet auch, das quantitative Verhältnis der einzelnen markierten Verbindungen zu bestimmen. Für die quantitative Auswertung erwies sich auch eine Kombination von Radioautographie und Radiochromatographie in vielen Fällen als sehr günstig: nach der Herstellung eines Radioautogrammes wurden die den Schwärzungen entsprechenden Flecke des Papierchromatogrammes ausgeschnitten und unter dem Geigerzähler direkt ausgemessen.

2. Papierchromatographie

Im allgemeinen wurde Whatman-Papier Nr. 1 verwendet. Die Trennung erfolgte im absteigenden Verfahren bei 18 bis 20 °C. In Tabelle 1 sind die R_f-Werte und die Nachweismöglichkeiten von verschiedenen Stoffen, die im Zusammenhange mit der Fusarinsäure von Interesse sind, zusammengestellt. Die Nachweisgrenze liegt bei allen Verbindungen bei ungefähr 10 γ chromatographierter Substanz. Über die Papierchromatographie weiterer Verwandter der Fusarinsäure findet sich eine Übersicht bei HOHL (1959).

a) Laufmittelsysteme

1. Sekundäres Butanol — Ameisensäure — Wasser (75 : 15 : 10);
2. Laufmittel 3 modifiziert nach BUSH (1952): 666 ml Heptan, 334 ml Benzol, 800 ml Methanol, 200 ml Wasser; die vier Komponenten werden

vermischt, und 60 ml der oberen Phase, 20 ml der unteren Phase und 1 ml konzentriertes Ammoniak werden geschüttelt. Die obere Phase dieses neuen Gemisches wird als Laufmittel verwendet, während die untere Phase auf den Grund des Chromatographiegefäßes gegeben wird;

3. n-Butanol — Ameisensäure — Wasser (50 : 10 : 40);
4. Sekundäres Butanol — konzentriertes Ammoniak — Wasser (75 : 15 : 10);
5. n-Butanol — konzentriertes Ammoniak — Tetrachlorkohlenstoff (67 : 22 : 11). Das Gemisch wird mit KH_2PO_4 geschüttelt, bis es klar ist. Die Papiere werden mit m/15 Phosphatpuffer von pH 7 nach SOERENSEN imprägniert.

b) Nachweisverfahren

U V - L a m p e. Fusarinsäure und verschiedene andere Pyridinderivate zeigen eine starke UV-Absorption und erscheinen daher auf Papierchromatogrammen in ultraviolettem Licht als dunkle Flecke.

B r o m k r e s o l g r ü n. Die Farbe einer 0,04 % Bromkresolgrünlösung in 95 % Äthanol wird mit verdünnter Natronlauge auf Blaugrün eingestellt. Allgemein erscheinen Säuren gelb und Basen blau gegen einen blaugrünen Hintergrund (WACKER 1956). Der untere Rand des gelben Flecks der folgenden Pyridincarbonsäuren besitzt eine charakteristische rotviolette Färbung:

Tabelle 1

Papierchromatographie einiger Pyridinderivate

Substanz	Nachweis			R_f-Werte in Laufmittel				
	UV	DRAGENDORFF	KÖNIG	1	2	3	4	5
2-Picolinsäure	+	weiß	—	0,42				
5-Methyl-pyridin-2-carbonsäure	+	weiß	—	0,46				
5-Äthyl-pyridin-2-carbonsäure	+	orange	—	0,63				
Fusarinsäure	+	orange-rot	—	0,74	0,00	0,93	(0,50)	0,34
Fusarinsäure mit Fe^{++}	+	orange-rot	—	0,84				0,34
Cu^{++}	+	rot	—	0,86				0,45
Co^{++}	—	—	—	0,85				(0,50)
Fusarinsäureamid	+	orange-rot	—	0,87	0,55			0,85
Fusarinsäureamid-chlormethylat	+	orange	—	0,62				0,26
Butylpyridin	—	orange-rot	rosa	0,72	0,95	0,94	0,93	0,87
Nicotinsäure	+	—	rot	0,63	0,00	0,78	0,40	0,11
Nicotinsäureamid	+	—	gelb	0,47	0,00	0,80	0,85	0,58

Klammern um R_f-Werte bedeuten, daß die entsprechenden Flecke langgestreckt sind.

2-Picolinsäure, 5-Methyl-pyridin-2-carbonsäure, 5-Äthyl-pyridin-2-carbonsäure und Fusarinsäure.

Reagens nach DRAGENDORFF. Fusarinsäure und verschiedene andere Stickstoffbasen ergeben nach dem Besprühen meist orangefarbene Flecke. Nach einigen Tagen bleicht der Hintergrund aus, so daß die Flecke scharf begrenzt erscheinen. Das Reagens wird aus zwei Lösungen zusammengestellt. Lösung A: 850 mg Wismutsubnitrat, 10 ml Eisessig, 40 ml Wasser; Lösung B: 8 g Kaliumjodid, 20 ml Wasser. Die beiden Lösungen ergeben zusammen die Stammlösung, welche im Dunkeln unbegrenzt haltbar ist. Vor dem Sprühen wird 1 ml Stammlösung mit 2 ml Eisessig und 10 ml Wasser verdünnt (MUNIER und MACHEBOEUF 1949).

Reagens nach KÖNIG. Das Papierchromatogramm wird mit einer 1 % Lösung von p-Aminobenzoesäure besprüht, getrocknet und 15 Minuten in ein Gefäß gehängt, auf dessen Grund einige Kristalle von Bromcyanid liegen. Pyridinderivate, welche in α-Stellung zum Stickstoff keine Substituenten aufweisen, ergeben gelbe bis rote Flecke (KÖNIG 1904, ARONOFF 1956).

3. Behandlung von Tomatensprossen

Die Vergiftung von Tomatensprossen mit Fusarinsäure erfolgte nach der Methode des Welketestes (GÄUMANN, NAEF-ROTH und MIESCHER 1950; GÄUMANN, NAEF-ROTH, REUSSER und AMMANN 1952). Tomatenpflanzen der Sorte Tuckswood wurden im Vierblattstadium über dem Boden abgeschnitten, die Oberteile (Sprosse) bei konstanten Bedingungen (Temperatur, Feuchtigkeit, Belichtung) in eine $5 \cdot 10^{-3}$ molare wäßrige Lösung von Fusarinsäure gestellt und so lange darin belassen, bis je Kilogramm Frischgewicht 150 mg Toxin (dosis minima) aufgenommen waren.

4. Kultur der Mikroorganismen

a) Flüssige Medien

Die Pilze wurden bei 27 °C auf einer Schüttelmaschine inkubiert. Als Kulturgefäße dienten in der Regel 500-ml-Erlenmeyerkolben mit 100 ml Nährlösung. Abweichungen von diesen Kulturbedingungen werden bei den einzelnen Versuchen besonders vermerkt.

Folgende Nährlösungen kamen zur Anwendung:

Nährlösung Sa:

Bactopepton	3,5 g
Bacto Hefeextrakt	30 g
Glukose	30 g
Kaliumdihydrogenphosphat	2 g
Magnesiumsulfat	0,5 g

dest. Wasser auf 1000 ml, pH 5,5

Nährlösung Gr:

Hefeextract DIFCO	4 g
Malzextrakt	10 g
Glukose	4 g

Leitungswasser auf 1000 ml, pH 5,7

Nährlösung R 2:

Weinsäure	2,66 g
Ammontartrat	2,66 g
Ammonphosphat	0,4 g
Kaliumcarbonat	0,4 g
Magnesiumcarbonat	0,27 g
Ammonsulfat	0,17 g
Eisensulfat	0,05 g
Zinksulfat	0,05 g
Saccharose	20 g

dest. Wasser auf 1000 ml

Nährlösung VSF:

Calciumnitrat	1 g
Magnesiumsulfat	0,25 g
Kaliumdihydrogenphosphat	0,25 g
Kaliumchlorid	0,25 g
Eisenchlorid	0,01 g
Hefeextrakt Difco	5 g
Glukose	20 g

dest. Wasser auf 1000 ml

Nährlösung Ri 5:

Kaliumdihydrogenphosphat	5 g
Ammonnitrat	10 g
Magnesiumsulfat	2,5 g
Eisenchlorid	0,02 g
Glukose	50 g

dest. Wasser auf 1000 ml

Die Nährlösungen wurden im Autoklaven während 20 Minuten bei 120 °C sterilisiert. In der Regel wurde mit einer Sporensuspension beimpft.

b) Feste Medien

Nährböden für Nicotinsäurebestimmung:

Niacin Assay Medium (Difco B 322)	12,5 g
Difco Agar vitaminfrei	5 g

dest. Wasser 330 ml

Fleischextraktagar:

Oxo Lab Lemco	3 g
Pepton Ciba B	5 g
Natriumchlorid	2,5 g
Agar	15 g

Leitungswasser auf 1000 ml, pH 7,2

Malzextraktagar:

Malzextrakt	20 g
Agar	15 g

Leitungswasser auf 1000 ml, pH nicht eingestellt

Synthetischer Nährboden nach JUILLARD (1957):

Dikaliumhydrogenphosphat	7 g
Kaliumdihydrogenphosphat	3 g
Trinatriumcitrat	0,5 g
Magnesiumsulfat	0,1 g
Ammonsulfat	1 g
Glukose	2 g
Agar	15 g

dest. Wasser auf 1000 ml, pH 6,8

2. KAPITEL

UMWANDLUNGEN DER FUSARINSÄURE IN TOMATENSPROSSEN

1. Hydrophile Umwandlungsprodukte

Wie einleitend erwähnt wurde, konnten bis heute vier Umwandlungsprodukte der Fusarinsäure in Tomatensprossen nachgewiesen werden. Eines davon ist Kohlendioxyd; ein weiteres konnte von KLUEPFEL (1957) als Fusarinsäureamidchlormethylat identifiziert werden, während die Identität zweier hydrophiler Substanzen unbekannt ist. Im folgenden werden Versuche beschrieben, die zur Anreicherung und Charakterisierung dieser beiden Stoffe beitragen sollen.

a) Anreicherung

In jedem Versuch wurden fünf Tomatensprosse mit Carboxyl-markierter Fusarinsäure (dosis minima) vergiftet und nach 48 Stunden mit 80 % Alkohol extrahiert. Nach dem Einengen wurde der Extrakt bei pH 3,0 und 8,0 mit Essigester ausgeschüttelt. Die wäßrige Phase, welche allein weiter verarbeitet wurde, enthielt 18 bis 29 % der eingesetzten Aktivität. Die entsprechende Zahl wurde von KLUEPFEL zu 26 % bestimmt.

Im ersten Versuch wurden den Tomatensprossen 1,45 mg Fusarinsäure verabreicht. Der wäßrige Extrakt enthielt bei einem Gewicht von 187 mg 18 % der eingesetzten Aktivität. Unter der Annahme, daß sich die spezifische Aktivität der Umwandlungsprodukte nicht von derjenigen der eingesetzten Fusarinsäure unterscheidet, enthält der wäßrige Extrakt 0,14 Gewichtsprozent radioaktive Substanzen.

Der wäßrige Extrakt wurde am Vakuum zur Trockene eingeengt und der Rückstand dreimal mit 3 ml Methanol extrahiert. Nach dem Zentrifugieren enthielt der Extrakt bei einem Gewicht von 56 mg 9,9 % der eingesetzten Radioaktivität. Die beiden unbekannten Substanzen konnten somit auf eine Konzentration von 0,26 % angereichert werden. Der Extrakt wurde aus der methanolischen Lösung in Wasser überführt und an einem Kationenaustauscher (5 ml Dowex-50 in der H-Form) weiter aufgetrennt (Tab. 2).

Tabelle 2

Elution	Fraktionen	
	Gewicht in mg	Radioaktivität in %
Wasser	25,1	18,2
Ammoniak		
0,001 n	0,8	5,1
0,01 n	0,6	5,6
0,1 n	1,0	4,5
1 n	15,0	66,6
Total	42,5	100

Die aktiven Stoffe sind somit im letzten Eluat in einer Konzentration von 0,44 % vorhanden. Im Laufmittel 1 wurden für die beiden in diesem Extrakt enthaltenen Umwandlungsprodukte R_f-Werte von 0,11 und 0,52 erhalten.

In zwei weiteren Versuchen konnten die beiden unbekannten Stoffe mit der gleichen Methode auf eine Konzentration von 0,94 % und 1,08 % angereichert werden. Die so gewonnenen Extrakte gestatteten infolge ihrer Konzentration und der relativ hohen spezifischen Aktivität der eingesetzten Fusarinsäure die Durchführung einiger chromatographischer Versuche.

b) Zahl der unbekannten radioaktiven Stoffe

In einem Radiochromatogramm, welches in Laufmittel 1 erhalten wurde, liegen zwei ausgeprägte Maxima bei R_f-Werten von 0,09 und 0,50 (Abb. 1). Die Stoffe, welche diese Maxima verursachen, werden im weiteren als Substanz 1 (0,09) und Substanz 2 (0,50) bezeichnet. Ein kleineres Maximum, welches wahrscheinlich von nicht vollständig extrahierter Fusarinsäure herrührt, liegt bei einem R_f-Wert von 0,82. Zusätzlich sind zwei nur schwach ausgeprägte Maxima bei 0,05 und 0,23 erkennbar.

Die bei einem R_f-Wert von 0,23 liegende aktive Substanz konnte auch radioautographisch in zweidimensionalen Chromatogrammen nachgewiesen werden. Diese Substanz, welche in sehr kleinen Mengen auftritt, ist das fünfte Umwandlungsprodukt, dessen Entstehung in Tomatensprossen aus Fusarinsäure nachgewiesen werden konnte.

c) Möglichkeit einer chemischen Veränderung der Umwandlungsprodukte der Fusarinsäure

Bei einem Anreicherungsversuch wurde Substanz 1 aus einem Papierchromatogramm eluiert und auf einen Ionenaustauscher gegeben. Wie erwartet, konnte die Substanz mit 1 n Säure wieder eluiert werden, wogegen nach Elution mit konzentrierter Salzsäure eine Substanz mit dem gleichen R_f-Wert wie Substanz 2 auftrat.

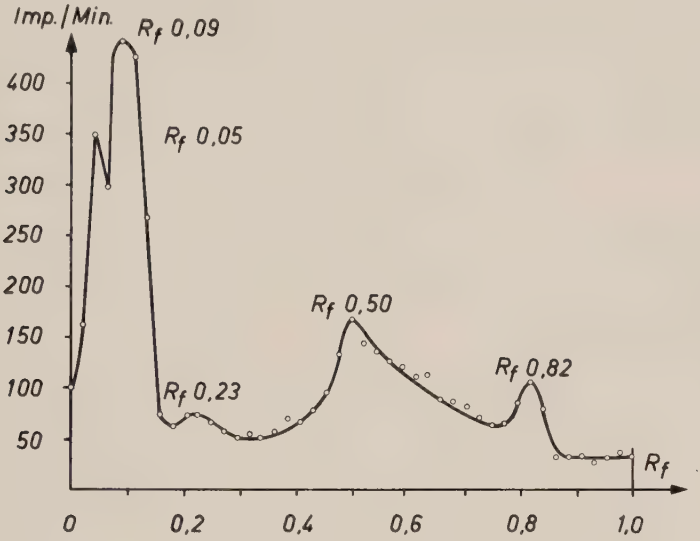


Abb. 1. Radiochromatogramm der hydrophilen Umwandlungsprodukte der Fusarinsäure in Tomatensprossen

Diese Beobachtung konnte in einem weiteren Versuch bestätigt werden. Diejenige Zone eines Papierchromatogrammes, welche Substanz 1 enthielt (R_f 0,02 bis 0,23), wurde mit Wasser eluiert. Das Eluat wurde in zwei Hälften von 0,5 ml geteilt, von denen die eine mit 1 ml konzentrierter Salz-

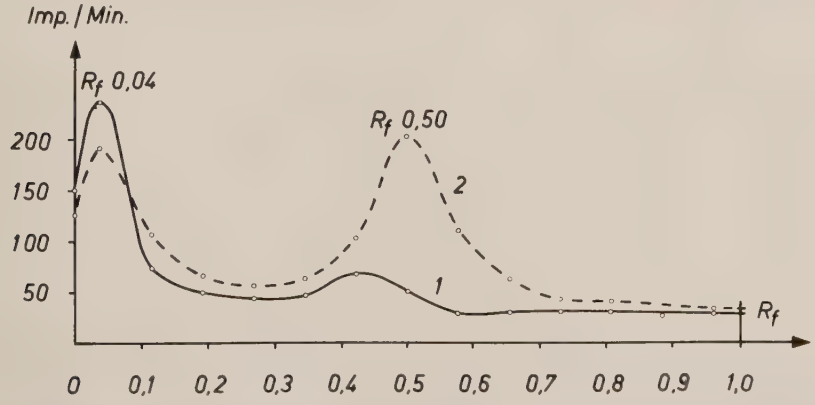


Abb. 2. Radiochromatogramme eines der hydrophilen Umwandlungsprodukte der Fusarinsäure vor (Kurve 1) und nach Behandlung mit konzentrierter Salzsäure (Kurve 2)

säure versetzt wurde. Die Lösungen wurden bei Zimmertemperatur eine Stunde inkubiert. Nach Entfernen der Salzsäure wurden Radiochromatogramme hergestellt, welche das in Abbildung 2 ersichtliche Bild ergaben.

Auch hier wurde unter dem Einfluß der Salzsäure ein Teil der Substanz 1 in eine solche verwandelt, die den gleichen R_f-Wert besitzt wie Substanz 2. Der Einwand, daß die Salzsäure lediglich die chromatographischen Eigenschaften der Substanzen durch Störung des Gleichgewichtes zwischen Salzen und freien Säuren beeinträchtigt habe, ist nicht stichhaltig, da das Fließmittel selbst stark sauer ist (15 % Ameisensäure) und eine Behandlung von Substanz 1 mit 1 n Säure die chromatographischen Eigenschaften nicht verändert hatte. Somit erscheint eine hydrolytische Umwandlung von Substanz 1 in Substanz 2 möglich.

d) Identifizierungsversuch

Die R_f-Werte von Substanz 2 und Fusarinsäureamidchlormethylat sind nur wenig verschieden (0,50 bzw. 0,61). Daher stellte sich die Frage, ob es sich bei Substanz 2 nicht um Fusarinsäureamidchlormethylat handelte, welches nicht vollständig extrahiert wurde.

Fünf Tomatensprosse wurden mit Fusarinsäure vergiftet und mit 80 % Alkohol extrahiert. Bei pH 3,0 wurde die wäßrige Lösung fünf Tage in einem Kutscher-Steudel-Apparat extrahiert. Die basischen Stoffe (einschließlich Fusarinsäureamidchlormethylat) wurden in der wäßrigen Phase belassen. Sowohl im Radioautogramm wie auch im Radiochromatogramm konnten zwei deutlich getrennte radioaktive Flecke mit R_f-Werten von 0,50 und 0,63 nachgewiesen werden. Auf den Startfleck des einen Chromatogrammes wurde gleichzeitig mit dem Extrakt eine kleine Menge Fusarinsäureamidchlormethylat aufgetragen, welches ebenfalls einen R_f-Wert von 0,63 erreichte und sich dort mit dem Dragendorff-Reagens nachweisen ließ. Aus diesen Befunden geht hervor, daß Substanz 2 nicht mit Fusarinsäureamidchlormethylat identisch ist.

2. Abbau der Fusarinsäure zu Kohlendioxyd

SANWAL (1956) konnte zeigen, daß nach Verabreichung von Carboxyl-markierter Fusarinsäure an Tomatensprosse etwa 10 % der eingesetzten Radioaktivität in $^{14}CO_2$ ausgeschieden werden. Aus diesem Ergebnis wurde geschlossen, daß die Fusarinsäure von der Pflanze decarboxyliert wird und daß als erstes Umwandlungsprodukt Butylpyridin auftreten sollte. Es stellte sich nun die Frage, ob nach Verabreichung von Kern-markierter Fusarinsäure ebenfalls radioaktives Kohlendioxyd in der Luft nachgewiesen werden könne.

a) Methode

Zehn Tomatensprosse wurden unter eine Glasglocke gestellt, deren Zuluft von CO_2 befreit wurde. Das CO_2 der Abluft wurde in einem Kaliapparat nach FRIEDRICHS in 20 ml 0,2 n Natronlauge aufgefangen. Der Luftdurchfluß wurde durch eine Wasserstrahlpumpe erreicht. Zur Aktivitäts-

bestimmung wurde das CO_2 in $BaCO_3$ überführt (siehe Seite 200). Die Bestimmungen wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen je einmal durchgeführt. Während der Versuche wurden die Pflanzen in eine 0,01 n NaH_2PO_4-Lösung gestellt, welche die Kohlendioxydausscheidung fördert (Weintraub, Brown, Fields und Rohan 1952). Ein eigener Versuch ergab, daß die Ausscheidung von $^{14}CO_2$ ohne den Zusatz von Phosphat um den Faktor 10^5 vermindert wird.

b) Vergleich bei Applikation verschieden markierter Fusarinsäure

In mehreren Wiederholungen wurde Kern- oder Carboxyl-markierte Fusarinsäure an Tomatensprosse verabreicht und die Aktivität des ausgeschiedenen $^{14}CO_2$ bestimmt. Für je einen Versuch sind die Ergebnisse in Abbildung 3 zusammengestellt. Weitere Versuche haben ähnliche Resultate ergeben, doch können von einem Versuch zum anderen beträchtliche Schwankungen auftreten, wie dies bereits von Sanwal (1956) festgestellt wurde.

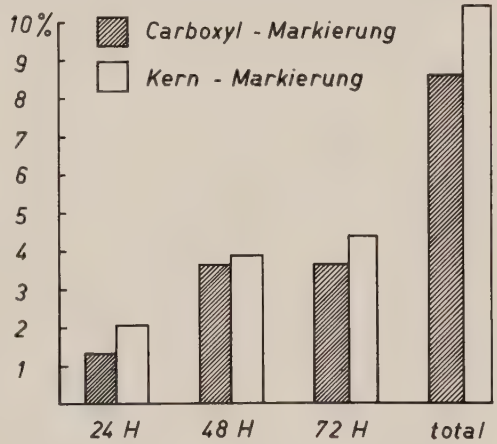


Abb. 3. Prozentualer Anteil der in $^{14}CO_2$ ausgeschiedenen Radioaktivität nach Verabreichung verschieden markierter Fusarinsäure an Tomatensprosse

Ein gleicher Anteil Kern- und Carboxyl-markierter Fusarinsäure wird von Tomatensprossen zu $^{14}CO_2$ abgebaut. Der Abbau der Kern-markierten Fusuarinsäure zeigt, daß entweder die ganze Seitenkette abgebaut wird (25 % der Markierung befinden sich im C-1 der Butylseitenkette) oder daß der Pyridinkern aufgespalten und ganz abgebaut wird. Beide Arten des Abbaues zum CO_2 lassen eine größere Zahl von Zwischenprodukten erwarten: tatsächlich konnte im vorangehenden Abschnitt gezeigt werden, daß die Zahl der markierten Verbindungen im wäßrigen Extrakt größer ist, als bisher angenommen wurde. Es scheint nun auch möglich, daß die Carboxyl-markierte Fusarinsäure erst nach einem weitgehenden Abbau decarboxyliert wird, wobei kein Butylpyridin mehr gebildet würde. Diese Frage soll im folgenden Abschnitt untersucht werden.

3. Umwandlung der Fusarinsäure zu Butylpyridin

a) Methode

Die Extraktion beruht darauf, daß Butylpyridin als freie Base lipophil ist, während das feste Hydrochlorid gute Wasserlöslichkeit aufweist. Nach der Behandlung mit Fusarinsäure wurden Tomatensprosse unter Zugabe von Trockeneis in einem „Turmix" zerschlagen, worauf das Homogenat in einem

Soxhlet-Apparat während 48 Stunden mit Aceton extrahiert wurde. Je Gramm Frischgewicht der Tomatensprosse wurden 10 ml Extraktionsmittel verwendet. An Stelle der kontinuierlichen Acetonextraktion wurde in den ersten Versuchen schrittweise mit 0,01 n Salzsäure extrahiert. Diese Methode erwies sich infolge der Bildung stabiler Emulsionen beim anschließenden Ausschütteln als ungünstig. Der Acetonextrakt wurde nach Zugabe von 10 % 1 n Salzsäure auf kleines Volumen eingeengt, und die übrigbleibende wäßrige Lösung wurde zentrifugiert und bei einem pH von 3,5 und 8,5 je fünfmal mit Essigester ausgeschüttelt. Drei Blindversuche zeigten, daß die zweite Essigesterfraktion 75 bis 90 % des Butylpyridins enthielt, welches dem Pflanzenhomogenat zugefügt worden war.

Der zweite Essigesterextrakt wurde ohne Eindampfen fünfmal mit 0,01 n Salzsäure ausgeschüttelt. Die salzsaure Lösung (im folgenden als Salzsäureextrakt bezeichnet) wurde auf 3 ml eingeengt und dreimal mit 1 ml Essigester ausgeschüttelt (Essigesterextrakt). In der letzten Phase der Extraktion wurden sehr kleine Mengen Lösungsmittel verwendet, um die Lösung direkt auf Papierchromatogramme auftragen zu können.

Die in den Blindversuchen extrahierten Mengen Butylpyridin wurden im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 262,75 mμ gemessen, da Butylpyridin hier ein Absorptionsmaximum besitzt. Zur Papierchromatographie von Butylpyridin und zu seiner Unterscheidung von Fusarinsäure eignet sich Laufmittelsystem Nr. 5. In einer größeren Zahl weiterer Laufmittelsysteme besaßen Fusarinsäure und Butylpyridin sehr ähnliche R_f-Werte (siehe Seite 203). Zum Trocknen wurden die Chromatogramme nie erwärmt, um das Verdampfen von Butylpyridin zu verhindern. Chromatographiertes Butylpyridin kann aus dem Papier wieder quantitativ eluiert werden. Mit dem Dragendorff- oder König-Reagens lassen sich bis zu 10 γ Butylpyridin papierchromatographisch nachweisen.

b) Verhalten von Butylpyridin in Tomatensprossen

Da 3-n-Butylpyridin bei Zimmertemperatur flüssig ist (KP 206 °), war zu vermuten, daß es von Pflanzen gar nicht gespeichert, sondern wie ätherische Öle in der Dampfphase ausgeschieden wird. Im Welketest zeigt Butylpyridin eine eigenartige Wirkung: seine Giftigkeit hängt mehr von der applizierten Konzentration als von der verabreichten Dosis ab (Tab. 3). Dieser Effekt könnte entweder durch eine Entgiftung oder durch eine einfache Ausscheidung erklärt werden.

Im ersten Versuch wurde an zwei Gruppen von Tomatensprossen eine Dosis von 300 mg/kg Butylpyridin verabreicht. Die Substanz wurde als Hydrochlorid gelöst und das pH der $2{,}5 \cdot 10^{-3}$ molaren Lösung auf 5,0 eingestellt. Die Extraktion der behandelten Sprosse erfolgte nach der oben beschriebenen Methode, wobei bereits der erste Essigesterextrakt, der bei einem pH von 8,5 erhalten worden war, im Spektralphotometer ausgemessen wurde. Gleichartige Aufarbeitung unbehandelter Sprosse ergab einen vergleichbaren Blindwert.

Tabelle 3

Der Welkeeffekt von Butylpyridin auf junge Tomatensprosse
(unveröffentlichte Ergebnisse von Frau Dr. St. Naef-Roth)

Konzentration molar	Dosis mg/kg	Welkeindex	
		Blätter	Stengel
10^{-2}	340	0,5	2,5
5.10^{-3}	340	0,4	0,0

Die Aufnahme von Butylpyridin dauerte sechs Stunden. Die erste Gruppe von Pflanzen wurde unmittelbar nach dieser Zeit aufgearbeitet, während die zweite Gruppe für die nächsten 24 Stunden in Leitungswasser gestellt wurde. Die erhaltenen Extinktionswerte entsprachen nach Berücksichtigung der Blindwerte 37 bzw. 0 % des verabreichten Butylpyridins. Dies bedeutet, daß Butylpyridin bereits während der Aufnahme laufend umgewandelt oder ausgeschieden wird und daß es 24 Stunden nach beendigter Aufnahme gänzlich aus den Pflanzen verschwunden ist.

In einem weiteren Versuch sollte das Verschwinden des Butylpyridins erklärt werden. Zehn Tomatensprosse wurden in einer $2{,}5 \cdot 10^{-3}$ molaren Butylpyridinlösung unter eine Glasglocke gestellt. Mit einer Wasserstrahlpumpe wurde Zimmerluft durch die Apparatur gesaugt und die Abluft der Pflanzen durch 1 n Salzsäure in einem Kaliapparat nach Friedrichs geleitet. Die Sprosse wurden während 72 Stunden in der Butylpyridinlösung belassen, ohne daß sie dabei geschädigt wurden.

Die Aufarbeitung der Sprosse erfolgte nach dem Schema des vorangehenden Versuches. Der Salzsäureextrakt der Pflanzen, wie auch die Salzsäure des Kaliapparates, wurden im Spektralphotometer ausgemessen. Zur Ermittlung der Blindwerte dienten die beiden folgenden Versuche:

1. Eine gleiche Zahl von entsprechenden Tomatensprossen wurde während 72 Stunden in Wasser unter die Glasglocke gestellt und aufgearbeitet.

2. In den gleichen Gefäßen, in denen die Sprosse gestanden hatten, wurde eine Lösung von Butylpyridin ohne Tomatensprosse unter die Glasglocke gestellt, um die Verdampfung der Lösung und die Absorption von Butylpyridin im Kaliapparat zu bestimmen.

Mit Tomatensprossen verdampften unter der Glasglocke 24,0 ml Butylpyridinlösung, ohne Sprosse 4,5 ml, so daß die Sprosse allein 19,5 ml Lösung oder 330 mg Butylpyridin je kg Frischgewicht aufgenommen hatten, was eine Gesamtmenge von 6,57 mg ergibt. Die Extinktionen der Salzsäure des Kaliapparates entsprechen den folgenden Mengen Butylpyridin:

Pflanzen in Butylpyridinlösung . . . . 5,34 mg
Pflanzen in Wasser . . . . . 0,48 mg
verdampftes Butylpyridin aus der Lösung 1,72 mg

Von sämtlichen Fraktionen wurden UV-Spektren aufgenommen. Unter Berücksichtigung der Blindwerte waren sie bei denjenigen Fraktionen, in denen Butylpyridin erwartet wurde, kaum vom Spektrum des reinen Butylpyridins zu unterscheiden.

Aus den obigen Zahlen ergibt sich, daß von den 6,57 mg Butylpyridin, welche die Sprosse aufgenommen haben, 3,14 mg oder 48 % im Kaliapparat wiedergefunden wurden. Weitere 0,91 mg oder 14 % konnten in den Sprossen nachgewiesen werden.

Die Bilanz ergibt, daß 35 % des von den Pflanzen aufgenommenen Butylpyridins nicht wiedergefunden wurden. Die Differenz rührt wahrscheinlich davon her, daß ausgeschiedenes Butylpyridin in der Apparatur kondensierte, bevor es in die Absorberflüssigkeit gelangen konnte. Somit wären in diesem Versuch 50 bis 85 % des Butylpyridins von Tomatensprossen unverändert ausgeschieden worden. Zieht man ferner in Betracht, daß den Pflanzen nicht eine einmalige Dosis verabreicht wurde, sondern daß sie bis zum Abbruch des Versuches Butylpyridin aufnehmen konnten, so ergibt sich, daß Butylpyridin von Tomatensprossen fast quantitativ in der Dampfphase ausgeschieden wird.

Obschon Butylpyridin, welches mit dem Transpirationsstrom an Tomatensprosse verabreicht wird, also wieder ausgeschieden wird, steht nicht fest, daß es dem gleichen Schicksal erliegen würde, wenn es intrazellulär aus Fusarinsäure gebildet würde. Für das pathologische Geschehen wäre die Bildung an diesem Orte von besonderer Bedeutung, da ein entscheidender Eingriff in die Lebensvorgänge vor allem hier zu erwarten wäre. Der folgende Abschnitt beschäftigt sich daher mit der Möglichkeit der Umwandlung von Fusarinsäure zu Butylpyridin innerhalb der Pflanze.

c) Nachweisversuch von Butylpyridin als Umwandlungsprodukt der Fusarinsäure

Die Behandlung der Pflanzen war in allen Versuchen die gleiche: 20 Tomatensprosse wurden mit der dosis minima Kern-markierter Fusarinsäure vergiftet und nach 48 Stunden aufgearbeitet. Im ersten Versuch wurde das Homogenat in zwei Hälften geteilt, von denen der einen 30 mg Butylpyridin zugefügt wurden. In der Aufarbeitung zeigte es sich, daß der Salzsäureextrakt nur 0,27 % der eingesetzten Radioaktivität enthielt. Die Radiochromatogramme, für welche Laufmittel 5 verwendet wurde, waren für beide Hälften sehr ähnlich.

Etwa 80 % der Radioaktivität liegen bei einem R_f-Wert von 0,88. Ähnliche R_f-Werte besitzen Butylpyridin (0,87) und Fusarinsäureamid (0,85). Bei einem R_f-Wert von 0,24 befinden sich etwa 20 % der Radioaktivität, welche möglicherweise im Fusarinsäureamidchlormethylat (R_f 0,26) oder in der Fusarinsäure (R_f 0,29) enthalten sind. Die Zone des größeren Maximums beider Fraktionen wurde mit Essigester erschöpfend eluiert und quantitativ auf ein zweites Papierchromatogramm aufgetragen, für welches Laufmittel 2 Anwendung fand. Schwache, statistisch gesicherte Aktivitätsmaxima traten bei R_f 0,56 und 0,58 auf, wobei Fusarinsäureamid unter gleichen Bedingungen

einen R_f-Wert von 0,52 erreichte. An der Stelle des Butylpyridins (R_f 0,95) konnte keine Radioaktivität gefunden werden. Auf Grund dieser Tatsache und der im ersten Chromatogramm enthaltenen Aktivitäten ergibt sich, daß höchstens 0,20 % der eingesetzten Fusarinsäure in Butylpyridin hätten umgewandelt werden können.

Im zweiten Versuch wurde der Extrakt nach Zugabe von Butylpyridin gesamthaft aufgearbeitet. Das Radiochromatogramm zeigte das gleiche Bild wie im vorangehenden Versuch. Der bei einem R_f-Wert von 0,83 festgestellte radioaktive Fleck wurde ausgemessen und enthielt 0,13 % der in der Fusarinsäure eingesetzten Radioaktivität. An der gleichen Stelle wie die aktive Substanz befand sich das zugesetzte Butylpyridin, was durch Behandlung mit dem König-Reagens nachgewiesen wurde. Ein dritter Versuch zeitigte das gleiche Resultat: an der Stelle des Butylpyridins konnten im Papierchromatogramm 0,09 % der eingesetzten Radioaktivität nachgewiesen werden.

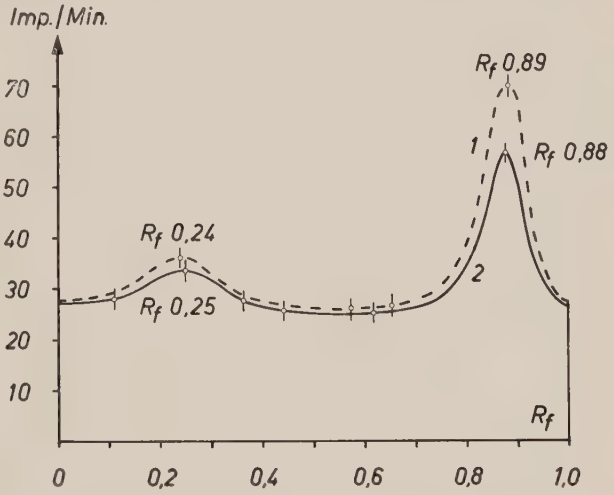


Abb. 4. Radiochromatogramm eines lipophilen Extraktes von Tomatenpflanzen, denen markierte Fusarinsäure verabreicht worden war. Der Fraktion 2 wurde vor der Aufarbeitung Butylpyridin zugesetzt

In drei Versuchen konnte also gezeigt werden, daß 0,15 % der eingesetzten Fusarinsäure in einen Stoff umgewandelt werden, der mit keinem der bisher gefundenen Umwandlungsprodukte der Fusarinsäure identisch ist. Handelt es sich bei diesem Stoff tatsächlich um Butylpyridin, so darf er bei Vergiftung von Tomatensprossen mit Carboxyl-markierter Fusarinsäure keine Radioaktivität mehr enthalten. Daher wurden in einem weiteren Versuch Tomatensprosse mit Carboxyl-markierter Fusarinsäure vergiftet und ohne Zusatz von Butylpyridin aufgearbeitet. Im Radiochromatogramm wurde auch hier bei einem R_f-Wert von 0,83 eine Aktivität gefunden, welche 0,14 % der eingesetzten Fusarinsäure entsprach. Dieser Wert ist gleich groß wie jener, der bei Vergiftung mit Kern-markierter Fusarinsäure erhalten wurde: in Tomatensprossen kann also kein Butylpyridin als Umwandlungsprodukt der Fusarinsäure nachgewiesen werden, wohl aber ein bisher nicht gefundener Stoff, der ein ähnliches papierchromatographisches Verhalten zeigt wie Fusarinsäureamid. Die Frage, ob es sich bei diesem neuen Stoff um ein Artefakt handle, kann verneint werden: wird nämlich einem Homogenat unbehandelter Tomatensprosse die übliche Menge Fusarinsäure mit

Carboxyl- oder Kernmarkierung beigefügt, so enthalten die hieraus hergestellten Radiochromatogramme an der entsprechenden Stelle keine Radioaktivität. Da das neu nachgewiesene Umwandlungsprodukt der Fusarinsäure in sehr kleinen Mengen auftritt (0,5 γ je Tomatensproß), stellen sich seiner Identifizierung auch mit der Methode der Papierchromatographie sehr große Schwierigkeiten entgegen, weshalb eine Anreicherung dieses Umwandlungsproduktes gar nicht in Angriff genommen wurde.

Oben wurde gezeigt, daß Butylpyridin, welches mit dem Transpirationsstrom in die Sprosse gelangt, rasch in die umgebende Atmosphäre ausgeschieden wird. Dies könnte auch das Schicksal desjenigen Butylpyridins sein, welches möglicherweise aus Fusarinsäure entsteht. Zur Klärung dieser Frage wurden 10 Tomatensprosse mit der dosis minima Kern-markierter Fusarinsäure behandelt und nach Aufnahme des Toxines in Leitungswasser unter eine Glasglocke gestellt. Die Abluft der Glasglocke wurde durch 1 n Salzsäure geleitet, um Butylpyridin als Hydrochlorid aufzufangen. Nach drei Tagen wurde die Salzsäure vorsichtig zur Trockne eingeengt und der Rückstand von 2,5 mg in eine Zählschale übertragen. Die Probe erwies sich dabei als inaktiv. Wären auch nur 0,01 % der im Versuch eingesetzten Radioaktivität in dieser Probe enthalten gewesen, so hätten sie noch mit statistischer Sicherheit nachgewiesen werden können.

Nach Behandlung von Tomatensprossen mit Fusarinsäure konnte also weder in den Pflanzen noch in der umgebenden Atmosphäre Butylpyridin nachgewiesen werden. Bei einem negativen Nachweis kann nicht behauptet werden, daß die in Frage stehende Substanz überhaupt nicht gebildet werde, sondern es muß angegeben werden, wo die Erfassungsgrenze der angewendeten Methode liegt. In unserem Falle steht fest, daß weniger als 0,1 % der eingesetzten Fusarinsäure in Butylpyridin umgewandelt werden. Selbst der Grenzwert ist zehnmal zu klein, um eine biologische Wirkung zu entfalten, da Butylpyridin im Plasmolysetest nur 100-, nicht aber 1000mal wirksamer ist als Fusarinsäure (BACHMANN 1956, GÄUMANN 1958). Im übrigen erscheint ein Vergleich zwischen Welkeversuch und Plasmolysetest im Lichte der neuen Befunde recht fraglich, da Butylpyridin von Tomatensprossen rasch ausgeschieden wird, während seine Konzentration beim Plasmolysetest innerhalb der Versuchsdauer konstant bleibt.

3. KAPITEL

UMWANDLUNGEN DER FUSARINSÄURE IN HOMOGENATEN VON TOMATENPFLANZEN

Da einem einzigen Tomatensproß nur rund 0,2 mg Fusarinsäure verabreicht werden können, müßte zur Isolierung und chemischen Charakterisierung der Umwandlungsprodukte eine sehr große Zahl von Pflanzen mit dem Toxin behandelt werden. Falls die Fusarinsäure in homogenisierten

Pflanzen ebenfalls verändert wird, könnten Umwandlungsprodukte mit dieser Methode auf einfache Art in größerer Menge erhalten werden.

1. Homogenisierung und Aufarbeitung

20 g Tomatensprosse wurden unter Zusatz von 200 ml 0,9 % Kochsalzlösung während 20 Minuten bei 0 °C im „Turmix" zerschlagen. Nach Zugabe der dosis minima radioaktiver Fusarinsäure wurde das Homogenat 3 Tage bei 3 ° inkubiert. Die folgenden Variationen der Methode hatten keinen Einfluß auf das Ergebnis: Verwendung von Saccharose an Stelle von Kochsalz, Homogenisierung im Potter-Kolben, Homogenisierung im Turmix mit Trockeneis.

Während der Inkubation wurden der Suspension täglich Proben entnommen, deren Rückstand nach dem Einengen immer die gleiche Radioaktivität aufwies. Die Fusarinsäure wurde also nicht zu Kohlendioxyd abgebaut. Nach fünftägiger Inkubation wurde das Filtrat bei pH 3,0 und 9,0 während je 24 Stunden im Kutscher-Steudel-Apparat mit Äther extrahiert. Die gesamte Radioaktivität ging dabei in den Säureextrakt über, dessen Radiochromatogramm in mehreren Versuchen ein ähnliches Bild ergab (Abb. 5).

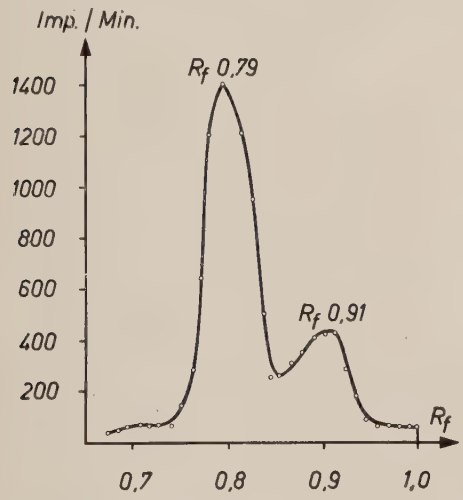


Abb. 5. Radiochromatogramm eines mit markierter Fusarinsäure versetzten Homogenates von Tomatenpflanzen. Es wurden keine radioaktiven Substanzen mit kleinerem R_f-Wert als 0,7 gefunden

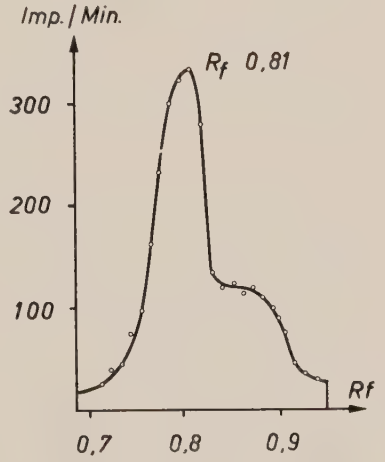


Abb. 6. Radiochromatogramm Carboxyl-markierter Fusarinsäure in Laufmittel 1

Im Gegensatz zu den Radiochromatogrammen intakter Tomatenpflanzen konnten hier nur zwei radioaktive Substanzen nachgewiesn werden: vor allem unveränderte Fusarinsäure mit einem R_f-Wert von 0,79 und ein in kleineren Mengen vorhandener Stoff mit einem R_f-Wert von 0,91. Zur Entstehung des zweiten Maximums der Aktivitätskurve wurden einige Identifizierungsversuche durchgeführt.

2. Identifizierungsversuche

Radiochromatogramme und Radioautogramme reiner Fusarinsäure zeigten in Laufmittel 1 ein unerwartetes Ergebnis (Abb. 6).

Die Aktivitätskurve ist nicht symmetrisch, sondern sie besitzt gegen die Front hin eine leichte Ausbuchtung. Die Ursachen für dieses Phänomen sind nicht bekannt: die verwendete (synthetische) Fusarinsäure hatte sich in den chemischen Analysen als rein erwiesen (HARDEGGER und NIKLES 1956).

Das Nebenmaximum der Aktivitätskurven in den Versuchen mit Tomatenhomogenaten kann also zu einem Teil bereits durch die Verteilung der reinen Fusarinsäure erklärt werden, zu einem andern Teil wird es aber durch andere Substanzen verursacht. Wie im folgenden Kapitel zu berichten ist, zeigten Kulturfiltrate verschiedener Pilze, die in Lösungen markierter Fusarinsäure inkubiert worden waren, in einer größeren Zahl von Versuchen ähnliche Radioautogramme: unmittelbar vor der durch Fusarinsäure verursachten Schwärzung (R_f 0,75) lag eine zweite, weniger intensive (R_f 0,85), deren Menge unabhängig davon war, wie und in welchem Ausmaße die Fusarinsäure sonstigen Veränderungen unterworfen war. Da die das zweite Maximum verursachende Substanz zudem bei jeder Homogenisierungsmethode auftritt, wird vermutet, daß ihre Bildung nicht von enzymatischen Reaktionen in der Pflanze abhängt. Auf diesem Wege könnten C h e l a t e oder andere Schwermetallverbindungen der Fusarinsäure gebildet werden. Im folgenden wurde daher untersucht, wie sich Fusarinsäure mit Zusätzen von Schwermetallen papierchromatographisch verhält.

3. Chelate der Fusarinsäure

Während die Bildung von Fusarinsäurechelaten mit Co, Ni, Cd, Cu und Fe von TAMARI und KAJI (1952, 1953) polarographisch nachgewiesen wurde, ist ihr papierchromatographisches Verhalten bisher nicht untersucht worden (DEUEL 1954).

Auf die Startflecke von Papierchromatogrammen wurden 10^{-4} mMol Metallsalze und 10^{-5} mMol markierte Fusarinsäure in wäßriger Lösung aufgetragen. UV-Absorption und Reaktion der Chromatogramme auf das Dragendorff-Reagens, sowie R_f-Werte und Form der Schwärzungen auf den Radioautogrammen wurden als Kriterien für das Auftreten von Chelaten benützt. Der Nachweis einer Chelatbildung war bei Co^{++}, Cu^{++}, Fe^{++} positiv und bei Ni^{++}, Zn^{++}, Sn^{++}, Mn^{++}, Hg^{++}, Pb^{++} negativ. Ein negatives Ergebnis bedeutet lediglich, daß Chelat und freie Fusarinsäure nicht unterschieden werden können; Chelatbildung ist jedoch auch hier möglich. Daß es sich um Chelate der Fusarinsäure und nicht um Salze handelt, geht aus ihrer guten Löslichkeit in organischen Solventien hervor. Entsprechend sind in Laufmittel 1 die R_f-Werte der Chelate höher als derjenige der freien Fusarinsäure (Tab. 1).

Mit der Methode der vorangehenden Versuche wurde Co^{++} mit steigenden Zusätzen von Fusarinsäure papierchromatographiert. Es wurde jedoch nicht markierte Fusarinsäure, sondern ^{60}Co und inaktive Fusarinsäure ver-

wendet. Kobalt erreichte allein einen R_f-Wert von 0,05; es wurde aber bei einer bestimmten Menge Fusarinsäure bis zu einem R_f-Wert von 0,94 verfrachtet (Abb. 7).

Nicht nur im bisher verwendeten sauren Laufmittel 1, sondern auch im basischen Laufmittel 5 unterscheiden sich die Fe-, Co- und Cu-Chelate von der freien Fusarinsäure. Papierchromatographisch sind die Chelate also stabil. Diese Chelate werden durch äquimolare Zusätze von Komplexon III (Äthylen-diamin-tetraessigsäure) nicht beeinflußt, da die Chelatbindung mit Fusarinsäure offenbar stärker ist als mit Komplexon III. Anderseits konnte kein Fusarinsäurechelat nachgewiesen werden, als äquimolare Mengen Fusarinsäure und Ferrioxamin B nach der üblichen Methode in Kontakt gebracht wurden. Dies beruht wahrscheinlich darauf, daß das Eisen im Ferrioxamin B stärker gebunden ist als im Fusarinsäurechelat.

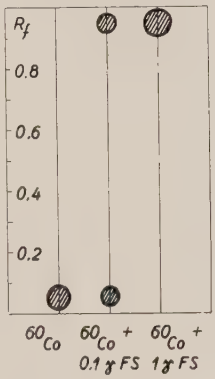


Abb. 7. Schematische Darstellung eines Radioautogrammes, auf dessen Startflecken 10^{-4} γ $^{60}CoCl_2$ und unterschiedliche Mengen inaktiver Fusarinsäure (FS) aufgetragen wurden

Die Chelate der Fusarinsäure besaßen im Laufmittel 1 in einem bestimmten Versuch die folgenden R_f-Werte: Fe 0,89, Co 0,92 und Cu 0,93; der R_f-Wert der freien Fusarinsäure betrug 0,81. In den Versuchen mit Tomatenhomogenaten lag das zweite Aktivitätsmaximum unter den gleichen Bedingungen der Papierchromatographie bei einem R_f-Wert von 0,91. Sowohl die Gleichheit der R_f-Werte, wie auch die Tatsache, daß jede lebende Zelle Schwermetalle enthält, welche bei der Zerstörung der Zelle teilweise frei werden, lassen den Schluß zu, daß das Aktivitätsmaximum mit einem R_f-Wert von 0,91 mindestens teilweise durch verschiedene Chelate der Fusarinsäure verursacht wird. Es erscheint fraglich, ob noch andere radioaktive Umwandlungsprodukte der Fusarinsäure an der gleichen Stelle auf dem Papierchromatogramm liegen, da bei den Versuchen mit Pilzen die Radioaktivität an der betreffenden Stelle mit der Inkubationszeit nicht zugenommen hat, was bei allen anderen beobachteten Umwandlungsprodukten der Fall war.

4. KAPITEL

UMWANDLUNGEN DER FUSARINSÄURE IN PILZKULTUREN

Im zweiten Kapitel wurde gezeigt, daß die hydrophilen Umwandlungsprodukte, welche in Tomatensprossen aus Fusarinsäure entstehen, zwar angereichert und teilweise chemisch charakterisiert werden können, daß eine Reindarstellung aber kaum möglich ist, da die Konzentration dieser Stoffe in Extrakten außerordentlich gering ist. Schließlich hat das vorangehende

Kapitel ergeben, daß Tomatenhomogenate die Fusarinsäure außer durch Chelierung chemisch nicht verändern. Daher wurde die Frage gestellt, ob Pilze imstande seien, die Fusarinsäure in die gleichen hydrophilen Stoffe umzuwandeln, welche auch in Tomatensprossen entstehen. Diese Fragestellung sollte gestatten, gleichzeitig zwei weitere Probleme zu klären:

Im Erdboden, welcher Pflanzenteile enthält, und in der Rhizosphäre von Tomatenpflanzen bilden *Fusarium vasinfectum* Atk. und *Fusarium lycopersici* beträchtliche Mengen Fusarinsäure (KALYANASUNDARAM 1958, KALYANASUNDARAM und BRAUN 1958). Wird das breite Wirkungsspektrum der Fusarinsäure (GÄUMANN 1957) in Betracht gezogen, so ist es sehr wahrscheinlich, daß das Toxin im Zusammenleben der verschiedenen Saprophyten eine wesentliche Rolle spielt. Wenn aber verschiedene Pilze das Toxin in inaktive Verbindungen umwandeln können, so würde es dadurch seine antibiotischen Eigenschaften einbüßen.

Eine Untersuchung der Umwandlung von Fusarinsäure in Kulturen von Pilzen, welche selber Fusarinsäure bilden, wird zeigen, ob das Toxin ein Ausscheidungsprodukt ist, welches nicht mehr in den ständigen Auf- und Abbau des Stoffwechsels einbezogen wird, oder ob es ein Zwischenprodukt ist, welches weiteren chemischen Veränderungen unterworfen ist.

Auf Grund dieser Überlegungen wurden die Umwandlungen der Fusarinsäure vor allem bei einigen weit verbreiteten Saprophyten und bei drei Fusarinsäurebildnern untersucht. Daneben wurde eine Hefe als Versuchsobjekt gewählt, da mit diesem Pilz eine größere Zahl von Versuchen über die Wirkung der Fusarinsäure durchgeführt worden war.

1. Umwandlungen der Fusarinsäure durch Hefe

Hefe (*Saccharomyces cerevisiae* Hans. Stamm ETH M 108) wurde in einer Nährlösung gezüchtet, welche 179 mg/l Carboxyl-markierte Fusarinsäure enthielt. Diese Toxinkonzentration hemmte das Wachstum der Hefe bereits stark, ohne es indessen ganz zu unterbinden (siehe Seite 229).

Die Hefe wurde in 60 ml Nährlösung Sa während 48 Stunden in Standkultur bei 23 °C gezüchtet. Anschließend wurde das Kulturfiltrat bei pH 3,0 und 7,7 mit Äther im Kutscher-Steudel-Apparat extrahiert. Die drei so gewonnenen Fraktionen wurden in Laufmittel 1 papierchromatographisch untersucht. Neben der Fusarinsäure (R_f 0,75) und einer Substanz mit einem R_f-Wert von 0,84 (mindestens teilweise Chelate der Fusarinsäure) enthielten die Ätherextrakte keine radioaktiven Verbindungen. Hingegen wurde in der wäßrigen Phase bei einem R_f-Wert von 0,45 eine radioaktive Substanz gefunden, die etwa 5 % der im Versuch eingesetzten Radioaktivität enthielt. Hefe vermag also die Fusarinsäure tatsächlich in einen hydrophilen Stoff umzuwandeln: die Umwandlungsrate ist indessen so klein, daß die Versuche mit der Hefe nicht weitergeführt wurden.

Die Papierchromatographie des wäßrigen Extraktes bot gewisse Schwierigkeiten, weil der R_f-Wert der neu gefundenen aktiven Substanz erst genau bestimmt werden konnte, nachdem die wäßrige Lösung eingeengt und der

Rückstand mit Methanol ausgezogen wurde. Auch diese Lösung enthielt noch viele Stoffe, teils aus der Nährlösung, teils vom Pilz stammend, welche bei der Papierchromatographie störten. Diese Schwierigkeiten könnten umgangen werden, wenn an Stelle der wachsenden Pilze ruhende Myzelien in nährstofffreien Lösungen von Fusarinsäure inkubiert würden. Zudem sollte sich mit dieser Methode die Isolierung von Umwandlungsprodukten einfacher gestalten, da die gesuchten hydrophilen Stoffe in höherer Konzentration zu erwarten sind. In den folgenden Versuchen wurde daher immer mit vorgewachsenen Myzelien („resting cells") gearbeitet.

2. Umwandlungen der Fusarinsäure durch zehn verschiedene Pilze

Die Bedingungen, unter denen die Myzelien gezüchtet wurden, sind in Tabelle 4 zusammengestellt und wurden so gewählt, daß überall ungefähr gleiche Mengen Myzel gebildet wurden.

Tabelle 4

Kultur verschiedener Pilze zur Gewinnung von Myzelien
(In der letzten Kolonne bedeutet + Inkubation in Schüttelkultur)

Pilz	Stamm ETH Nr.	Nährlösung	Kulturdauer (Tage)	Schüttelkultur
Fusarium lycopersici Sacc.	M 811	Ri 5	10	—
Gibberella Fujikuroi (Saw.) Woll.	M 118	Ri 5	15	+
Fusarium cubense E. F. S.	M 835	Ri 5	15	+
Fusarium culmorum (W. G. Sm.) Sacc. ..	M 4229	R 2	3	+
Leucostoma nivea (Fr.) v. H.	M 620	VSF	10	—
Penicillium roquefortii Thom.	M 97	Gr	4	+
Penicillium Trzebinskii Cal.	M 3585	Gr	4	+
Penicillium notatum Westl.	M 1615	Gr	4	+
Claviceps purpurea (Fr.) Tul.	M 3508	Gr	10	+
Aspergillus fumigatus Fres.	M 65	Gr	10	+

Die Myzelien aus je 100 ml Nährlösung wurden steril über einem Drahtgitter abfiltriert, mit 20 ml 0,9 % Kochsalzlösung gewaschen und in 20 ml 0,9 % Kochsalzlösung übertragen, welche 89 mg/l Kern-markierte Fusarinsäure enthielt. Nach 7 Tagen Inkubation als Standkulturen bei 27 °C wurden die Myzelien abfiltriert und gewaschen. Sie enthielten nicht mehr als 5 % der im Versuch eingesetzten Radioaktivität und wurden daher nicht weiter aufgearbeitet. Die Kulturfiltrate wurden bei pH 3,0 und 8,0 je fünfmal mit Essigester ausgeschüttelt. Die beim höheren pH gewonnenen Extrakte waren inaktiv und wurden verworfen, während die andern im Laufmittel 1 papierchromatographisch untersucht wurden (Fraktion EE). Die wäßrige Phase des Kulturfiltrates wurde zur Trockene eingeengt und der Rückstand mehrmals mit Methanol ausgezogen. Von der methanolischen Lösung wurden ebenfalls

Papierchromatogramme hergestellt (Fraktion W). Die markierten Verbindungen wurden in den Papierchromatogrammen radioautographisch nachgewiesen. Abbildung 8 gibt die schematische Darstellung der erhaltenen Radioautogramme wieder.

Aus der Abbildung 8 geht hervor, daß bei allen Pilzen neben der Fusarinsäure (R_f 0,75) weitere radioaktive Stoffe vorhanden sind; der größte Teil der Radioaktivität liegt jedoch in der Fusarinsäure vor. *Fusarium lycopersici* bildet eine Ausnahme: hier läßt sich keine markierte Fusarinsäure mehr nachweisen. Die Essigesterfraktion der meisten Pilze enthält eine oder mehrere aktive Substanzen, deren R_f-Wert um 0,10 Einheiten höher ist als derjenige der Fusarinsäure und mit den R_f-Werten der Fe-, Cu- und Co-Chelate der Fusarinsäure übereinstimmt. Auf Grund der entsprechenden R_f-Werte und der auf Seite 217 dargestellten Überlegungen muß es sich bei den in Frage stehenden Stoffen mindestens teilweise um Fusarinsäurechelate handeln.

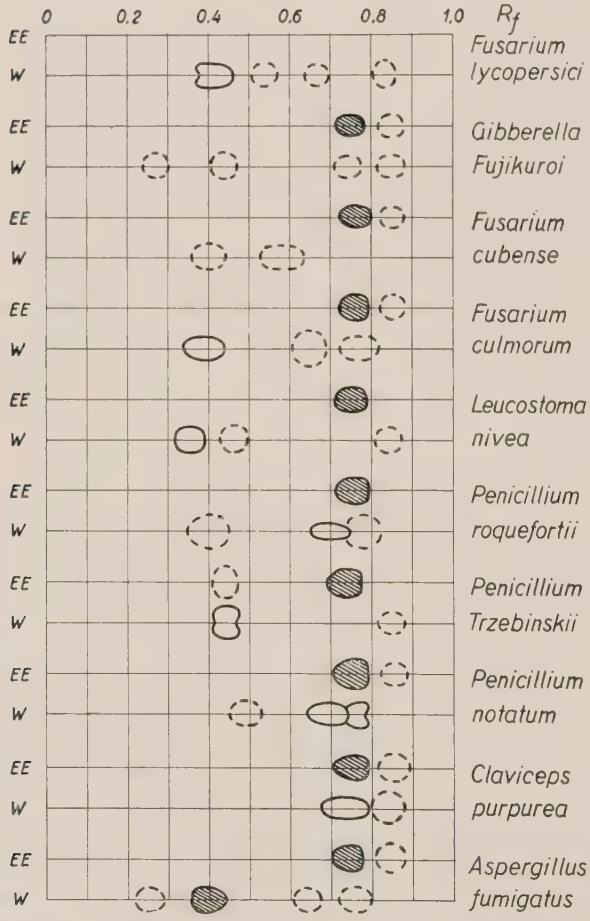


Abb. 8. Schematische Darstellung von Radioautogrammen der Kulturfiltrate verschiedener Pilze nach Inkubation in einer Lösung von markierter Fusarinsäure. Zunehmende Intensitäten der Schwärzung sind durch gestrichelte bzw. gezogene Umrisse und durch schraffierte Flächen wiedergegeben. Weitere Erklärungen im Text

Weiterhin geht aus der Abbildung 8 hervor, daß mit Ausnahme von *Claviceps purpurea* bei allen Pilzen eines oder mehrere hydrophile Umwandlungsprodukte der Fusarinsäure entstanden sind. Bei acht von den zehn untersuchten Pilzen tritt eine einheitlich erscheinende Schwärzung bei einem R_f-Wert von ungefähr 0,40 auf. Den gleichen Wert besaß das hydrophile Umwandlungsprodukt der Fusarinsäure, welches bei der Hefe nachgewiesen wurde. Die Vermutung liegt daher nahe, daß die verschiedenen Pilze die Fusarinsäure zum

gleichen Stoff umwandeln. Da es sich bei diesem Stoff um ein Artefakt der Papierchromatographie handeln könnte, wurde dem methanolischen Extrakt von *Aspergillus fumigatus* eine kleine Menge markierter Fusarinsäure zugesetzt. Im Radioautogramm entstand wiederum eine Schwärzung bei einem R_f-Wert von 0,40 und daneben die durch die Fusarinsäure verursachte Schwärzung bei einem R_f-Wert von 0,75. Damit ist erwiesen, daß die erste Schwärzung nicht von unveränderter Fusarinsäure herrührt. Dieses Ergebnis wird durch die folgenden Versuche bestätigt, bei denen für eine engere Auswahl von Pilzen die Umwandlung der Fusarinsäure bei verschiedenen Inkubationszeiten untersucht wurden.

3. Umwandlungen der Fusarinsäure durch *Fusarium lycopersici*, *Gibberella Fujikuroi* und *Penicillium Trzebinskii* bei verschiedenen Inkubationszeiten

Folgende Gründe waren für die Auswahl dieser drei Pilze maßgebend: Als Vertreter einer weit verbreiteten saprophytischen Gattung wurde *Penicillium Trzebinskii* gewählt, von dem bereits im letzten Abschnitt gezeigt wurde, daß er die Fusarinsäure zu einem beträchtlichen Teil umwandelt. Die beiden anderen Pilze bilden selber Fusarinsäure, doch ist die Toxinproduktion der verwendeten Stämme sehr verschieden. Im Kulturfiltrat von *Fusarium lycopersici* kann während der Züchtungsphase nur sehr wenig Fusarinsäure nachgewiesen werden, während das Kulturfiltrat von *Gibberella Fujikuroi* viel Fusarinsäure enthält. Diese Tatsache ist von Interesse, da zwischen Fusarinsäuregehalt und -abbau eine Beziehung bestehen könnte. Im übrigen wurden diese beiden Pilze verwendet, da sie einen beträchtlichen Anteil der verabreichten Fusarinsäure umwandeln können.

Die drei Pilze wurden in je 5 Erlenmeyerkolben in 100 ml Ri 5-Nährlösung während 7 Tagen bei 27 °C auf der Schüttelmaschine kultiviert. Das Myzel der fünf Kolben wurde gemeinsam abzentrifugiert (300 g), während einer Stunde in 250 ml m/10 Phosphatpuffer pH 5,6 (Soerensen) inkubiert, zentrifugiert und nochmals mit gleichen Mengen Puffer gewaschen und abzentrifugiert. Das gereinigte Myzel wurde in 100 ml Phosphatpuffer übertragen, welcher 179 mg/l Kern-markierte Fusarinsäure enthielt. Den Myzelsuspensionen, welche bei 27 ° geschüttelt wurden, entnahm man nach 2, 8, 24 und 96 Stunden jeweils Proben von 20 ml. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Die Proben wurden auf folgende Weise aufgearbeitet: Nach Einstellen von pH 3,5 wurde das Kulturfiltrat dreimal mit einem dreifachen Überschuß Essigester ausgeschüttelt. Die wäßrige Phase wurde durch Gefriertrocknung eingeengt und der feste Rückstand dreimal mit 5 ml 80 % Alkohol ausgezogen. Von beiden Fraktionen wurden im Laufmittel 1 Papierchromatogramme hergestellt, welche als Radioautogramme ausgewertet wurden. In Abbildung 9 sind die Radioautogramme schematisch wiedergegeben. Gemeinsam ist allen Proben, daß die Essigesterfraktionen Fusarinsäure (R_f 0,75) und einen oder mehrere Stoffe mit einem R_f-Wert von 0,85 enthalten. Ihre Menge ist nicht abhängig von der Inkubationszeit, wohl aber von der Menge

der noch vorhandenen Fusarinsäure. Aus diesen und den in den vorangehenden Abschnitten genannten Gründen handelt es sich hierbei mindestens teilweise um Chelate der Fusarinsäure.

Bei *Penicillium Trzebinskii* enthält die wäßrige Fraktion erst nach 96 Stunden zwei aktive Stoffe, deren R_f-Werte sich eindeutig von dem der Fusarinsäure unterscheiden. Von diesen beiden Stoffen werden jedoch nur geringe Mengen gebildet. *Penicillium Trzebinskii* vermag die Fursarinsäure also chemisch zu verändern; die Umwandlungsrate ist aber sehr klein. Im Gegensatz hierzu treten bei *Fusarium lycopersici* und *Gibberella Fujikuroi* Umwandlungsprodukte der Fusarinsäure rasch und in großen Mengen auf. Bei Versuchsabbruch (96 Stunden) sind bei beiden Pilzen ungefähr gleiche Mengen von Stoffen mit entsprechenden R_f-Werten vorhanden. Man kann daher annehmen, daß es sich bei beiden Pilzen mindestens teilweise um die gleichen Stoffe handelt. Es können mindestens drei verschiedene Stoffe unterschieden werden, welche ein anderes papierchromatographisches Verhalten zeigen als die Fusarinsäure und ihre Chelate. Einer der drei Stoffe wird in deutlich überwiegender Menge gebildet; er besitzt einen R_f-Wert von etwa 0,40 und ist bereits in den Versuchen des vorangehenden Abschnittes als ein Umwandlungsprodukt der Fusarinsäure bei verschiedenen Pilzen aufgefallen. Da dieses Hauptumwandlungsprodukt — im folgenden als Substanz H bezeichnet — in großen Mengen auftritt, spielt es möglicherweise im Ablauf von jenen Welkekrankheiten eine Rolle, wo Fusarinsäure als Welketoxin von entscheidender Bedeutung ist. Im folgenden Abschnitt werden daher Versuche beschrieben, die zu einer Reindarstellung und Charakterisierung von Substanz H führen sollen.

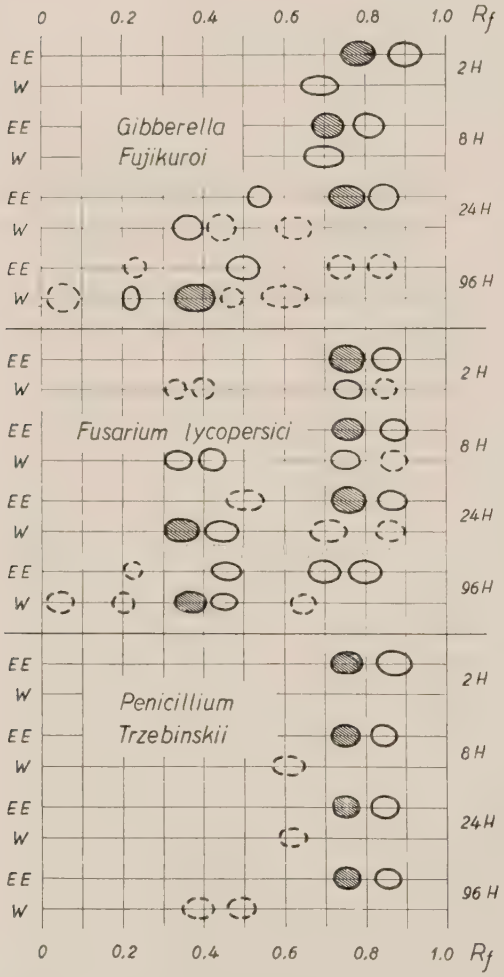


Abb. 9. Schematische Darstellung von Radioautogrammen der Kulturfiltrate dreier Pilze nach verschieden langer Inkubation in einer Lösung von markierter Fusarinsäure. Weitere Erklärungen im Text und bei Abbildung 8

Die Umwandlungsgeschwindigkeiten der Fusarinsäure bei *Fusarium lycopersici* und *Gibberella Fujikuroi* sind verschieden: beim ersten Pilz tritt Substanz H schon nach 2 Stunden auf, beim zweiten erst nach 24 Stunden. Die unterschiedliche Umwandlung bewirkt, daß selbst bei gleicher Toxinproduktion zweier Pilze der Fusarinsäuregehalt der Kulturflüssigkeit verschieden sein kann. Somit stellt jeder Kurvenwert im Fusarinsäure-Zeit-Diagramm die Differenz zwischen der total synthetisierten und abgebauten Menge dar.

4. Anreicherung und Charakterisierung von Substanz H

Von allen untersuchten Pilzen wandelt *Fusarium lycopersici* die Fusarinsäure am schnellsten und in größter Menge in Substanz H um, weshalb die weiteren Versuche mit diesem einen Pilz durchgeführt wurden. Um den gewünschten Stoff in guter Ausbeute zu erhalten, wurden vorerst einige Versuche über den Verlauf der Gärung durchgeführt.

a) Verlauf der Gärung

Fusarium lycopersici wuchs während 7 Tagen auf einer Schüttelmaschine bei 27 °C in einer Ri 5-Nährlösung. Das Myzel von je 2 Kulturen in 100 ml Nährlösung wurde bei 300 g steril abzentrifugiert und in 100 ml 0,9 % Kochsalzlösung, welche 179 mg/l Fusarinsäure enthielt, aufgeschwemmt. Die Myzelsuspensionen wurden in 500 ml Erlenmeyerkolben bei 27 ° auf einer Schüttelmaschine inkubiert. Eine wesentliche Erhöhung der Fusarinsäurekonzentration war nicht angängig: in einer fünfmal konzentrierten Lösung fand keine Umsetzung mehr statt, und zudem schien das Myzel zu autolysieren. Der Versuchszweck bestimmte jeweils die Radioaktivität der eingesetzten Fusarinsäure. Wurde nur mit wenigen Kolben der Verlauf der Gärung oder eine Methode der Aufarbeitung untersucht, so wurde unverdünnte, Kernmarkierte Fusarinsäure verwendet; bei der Produktion größerer Mengen Substanz H genügte eine Fusarinsäure, die zu 95 % aus inaktivem Material bestand.

Durch tägliche Entnahme von Proben wurde festgestellt, daß die Radioaktivität des Kulturfiltrates während der Gärung konstant bleibt; das bedeutet, daß die Fusarinsäure nicht veratmet wird, obwohl sie chemischen Veränderungen unterworfen ist. Zum gleichen Ergebnis führte ein Versuch, bei dem ununterbrochen Luft durch die Kulturlösung gesaugt und durch Natronlauge geleitet wurde: das in der Natronlauge aufgefangene Kohlendioxyd war inaktiv. Zur Kontrolle des normalen Gärungsverlaufes wurde das Kulturfiltrat aufgearbeitet. Es enthielt Substanz H und auch die anderen üblicherweise auftretenden Umwandlungsprodukte der Fusarinsäure.

Von den entnommenen Proben wurden in drei Parallelen je 1 ml Kulturfiltrat zur Trockne eingeengt und der Rückstand mit Methanol ausgezogen. Von den methanolischen Lösungen wurden in Fließmittel 1 Papierchromatogramme hergestellt, welche als Radioautogramme ausgewertet wurden. Es zeigte sich, daß sich die relativen Mengen der einzelnen Umwandlungsprodukte der Fusarinsäure bis zum fünften Tage veränderten. Daher wurde

im folgenden immer am sechsten Tage geerntet. Ein typisches Papierchromatogramm des Erntetages wurde als Radiochromatogramm ausgewertet (Abb. 10). Werden die Flächen unter der Kurve miteinander verglichen, so ergibt sich, daß 25 % der eingesetzten Aktivität in der Fusarinsäure verbleiben, 69 % in der Substanz H enthalten sind, während die restlichen 6 % in den übrigen aktiven Verbindungen eingebaut sind. Rund 70 % der verabreichten Fusarinsäure wurden also unter den hier gewählten Versuchsbedingungen zu Substanz H umgewandelt.

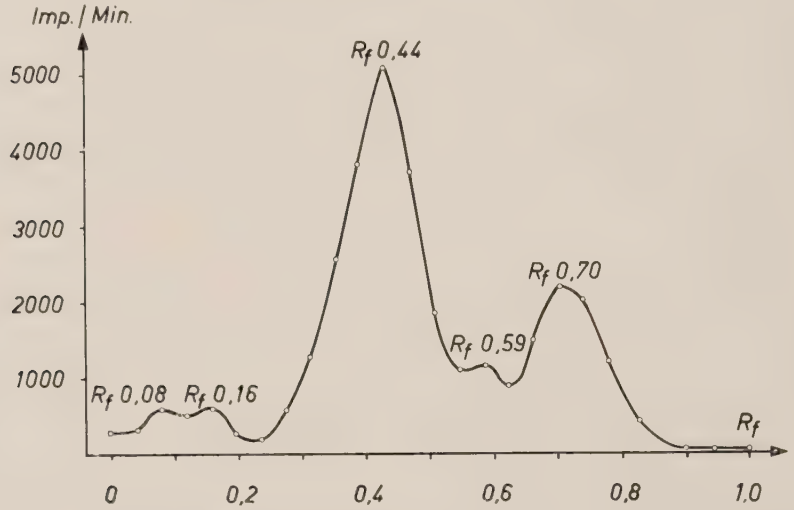


Abb. 10. Radiochromatogramm einer mit Fusarinsäure versetzten Kulturflüssigkeit von *Fusarium lycopersici*. Fusarinsäure R_f 0,70; Substanz H R_f 0,44

b) Anreicherung

Trotzdem nährstofffreie Myzelsuspensionen verwendet wurden, enthielten die Kulturfiltrate gelöste Stoffe in beträchtlicher Menge. Da Substanz H wie erwähnt nicht mit Essigester extrahierbar ist, stehen der Isolierung die gleichen Schwierigkeiten entgegen, wie sie bei der Reindarstellung wasserlöslicher Antibiotika auftreten.

Bisher wurde die wäßrige Phase lyophilisiert und mit 80 % Äthanol ausgezogen, wobei das verwendete Lösungsmittel auch durch Methanol, Äthanol oder n-Butanol ersetzt werden kann, nicht aber durch Essigester und Chloroform. Obwohl diese Methode gangbar ist, kann man sie für die Gewinnung von Substanz H nicht anwenden, da große Mengen Kulturfiltrat nicht ohne weiteres lyophilisiert werden können. Eine Konzentration des Kulturfiltrates zur Trockene ist mittels Destillation nicht möglich, da ein zähflüssiger Rückstand entsteht. Für die Gewinnung größerer Mengen Substanz H sollte daher eine Extraktion mit zwei nicht mischbaren flüssigen Phasen gefunden werden. Eines der hydrophilsten organischen Lösungsmittel, welches nur teilweise mit Wasser mischbar ist, ist n-Butanol. 100 ml Kulturfiltrat wurden bei pH 8,0 und 3,0 je zehnmal mit 100 ml n-Butanol ausgeschüttelt. Die erste Butanolfraktion enthielt 5 %, die zweite 84 % der

eingesetzten Radioaktivität. Von den verbleibenden 11 % konnten 5 % in der wäßrigen Phase nachgewiesen werden. Im Radioautogramm der zweiten Butanolfraktion konnte eine große Menge Substanz H nachgewiesen werden. Substanz H kann also bei tiefem pH mit n-Butanol extrahiert werden; der gesuchte Stoff muß daher eine organische Säure sein.

Nach dem Einengen auf 50 ml wurde die butanolische Lösung 10mal mit der gleichen Menge Bikarbonatlösung ausgeschüttelt. Die wäßrige Phase wurde auf 100 ml eingeengt, ihr pH vorsichtig auf 3,0 eingestellt und 10mal mit der gleichen Menge n-Butanol extrahiert. Die Aktivitätsbestimmungen ergaben, daß bei jedem Schritt rund 10 % der Aktivität im Rückstand verbleiben. Die letzte butanolische Lösung wurde zur Trockene eingeengt und der Rückstand fünfmal mit 5 ml Methanol ausgezogen. Mit diesem Extrakt, welcher von mehreren Ansätzen stammte, wurden einige chromatographische Versuche durchgeführt. Etwa 40 bis 50 % der im Versuch eingesetzten Aktivität waren jeweils in dieser Fraktion enthalten und — nach Radioautogrammen — zum größten Teil in Substanz H eingebaut.

An einer Aluminumoxydsäule der Aktivität I wurden die radioaktiven Stoffe quantitativ adsorbiert. Sie ließen sich weder mit Chloroform, Chloroform-Methanol noch mit Methanol eluieren. Mit Methanol-Wasser (1 : 1) konnten 5 % der aufgetragenen Aktivität eluiert werden; die entsprechenden Radioautogramme zeigten eine Schwärzung bei einem R_f-Wert von 0,48. Auch bei Verwendung stärker polarer Lösungsmittel (Wasser, Eisessig) ließ sich der Rest der aufgetragenen Aktivität nicht mehr aus der Säule auswaschen. Das gleiche Resultat wurde auch mit einer Aluminiumoxydsäule der Aktivität III erhalten. Wegen der äußerst schlechten Ausbeute eignen sich Aluminiumoxydsäulen daher nicht zur Anreicherung von Substanz H.

Da Substanz H eine Säure ist, sollte sie sich an einem basischen Ionenaustauscher anreichern lassen. Für die entsprechenden Versuche wurde der stark basische Dowex-1-Ionentauscher (OH-Form, 20—50 mesh, X-8) verwendet. Der Durchbruch dieses Tauschers erfolgt bei 1 mAeq/ml Harz (Hardegger 1957). Die benötigte Menge Ionentauscher wurde auf dieser Grundlage durch folgende Überlegungen bestimmt: Rechnet man mit einem mittleren Molekulargewicht von 100, einbasischen Säuren und einem Sicherheitsfaktor von 5, so müssen je Gramm aufgetragener Substanz 50 ml Harz verwendet werden. Das Verhältnis von Durchmesser zu Höhe der Säule lag zwischen 1 : 5 und 1 : 10; die Säulen wurden mit der 10fachen Menge ihres eigenen Volumens eluiert.

Die methanolischen Extrakte mit Substanz H wurden zur Trockene eingeengt, in Wasser aufgenommen und auf eine Ionentauschersäule gegeben. Mit Wasser, 0,01 und 0,1 n Ameisensäure wurden beträchtliche Substanzmengen, aber nur 5 % der aufgetragenen Aktivität eluiert, während mit 1 n Ameisensäure die Substanzmenge gering war, hingegen 80 % der aufgetragenen Aktivität eluiert werden konnten. Somit eignet sich ein basischer Ionenaustauscher sehr gut zur Anreicherung von Substanz H.

Zur Gewinnung größerer Mengen Substanz H wurden Ansätze von 5 oder 10 l Kulturfiltrat im Prinzip nach der oben angegebenen Methode

aufgearbeitet. Aus praktischen Gründen mußten jedoch die Mengen Extraktionsmittel beschränkt werden, wodurch die Ausbeute wesentlich geringer wurde. Vor der zweiten Extraktion der wäßrigen Phase mit Butanol wurde bei pH 3,0 mit Essigester ausgeschüttelt, um den größten Teil der noch vorhandenen Fusarinsäure zu entfernen. Von 10 l Kulturfiltrat wurden in einem bestimmten Ansatz im Ionentauschereluat 302 mg Festsubstanz mit 11 % der im Versuch eingesetzten Radioaktivität erhalten. Die spezifische Aktivität (Aktivität je mg) war 70 % derjenigen der verfütterten Fusarinsäure. Nimmt man an, daß Substanz H und Fusarinsäure das gleiche Molekulargewicht besitzen, und berücksichtigt man ferner, daß, wie das Radiochromatogramm zeigte, 70 % der Radioaktivität in Substanz H eingebaut sind, so besteht das feste Material dieser Fraktion zu 50 % aus Substanz H. Die Annahme eines ungefähr gleichen Molekulargewichtes von Fusarinsäure und Substanz H ist berechtigt, da es sehr unwahrscheinlich ist, daß die Fusarinsäure fast quantitativ in einen Stoff umgewandelt wird, der chemisch stark von ihr verschieden ist. Die hohe Reinheit der erhaltenen Fraktion wird weiter dadurch bestätigt, daß ein Teil der Substanz spontan aus Methanol auskristallisierte. Es steht zu hoffen, daß von dieser und ähnlichen Fraktionen chemische Analysen erhalten werden können.

c) Chemische Charakterisierung

Nach der oben beschriebenen Methode wurde durch Ausschütteln, Aufnehmen in Methanol und Trennung an einem Ionenaustauscher eine Fraktion erhalten, die 50 % Substanz H enthielt. In Laufmittel 1 wurde das Gemisch präparativ auf Whatman-3 MM-Papier weiter aufgetrennt. Die mit Hilfe der Autoradiographie als aktiv erkannte Zone mit einem R_f-Wert um 0,50 wurde mit Methanol eluiert. Der Extrakt wurde zur Trockene eingeengt und der Rückstand in Wasser aufgenommen. Die unlöslichen Bestandteile

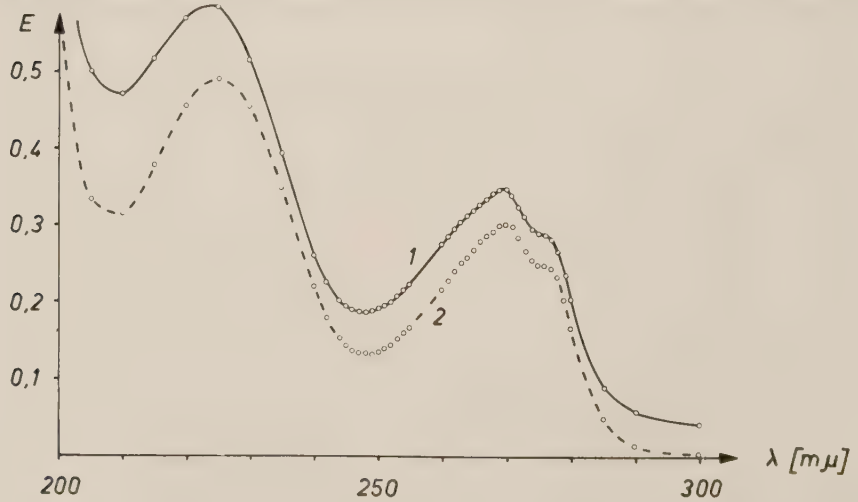


Abb. 11. UV-Spektren von Fusarinsäure (10 γ/ml; Kurve 2) und Substanz H (nach Radioaktivität 11,2 γ/ml; Kurve 1) in m/1000 Phosphatpuffer pH 7,0

wurden abzentrifugiert und verworfen. Die Lösung wurde eingeengt und bildete einen Rückstand von 57 mg, der zu 60 % aus Substanz H bestand. Er enthielt nach weiteren Radioautogrammen außer Substanz H keine radioaktiven Stoffe, somit auch keine Fusarinsäure. Diese Fraktion wurde für die chemische und biologische Charakterisierung verwendet.

Substanz H besitzt im Laufmittel 1 einen R_f-Wert von 0,48 und läßt sich mit Bromkresolgrün als gelber Fleck mit violettem vorderem Rand nachweisen. Sie ergibt mit dem Dragendorff-Reagens einen weißen Fleck, während mit dem König-Reagens keine Reaktion gefunden wurde. Von Substanz H und Fusarinsäure wurde unter gleichen Bedingungen ein UV-Absorptionspektrum aufgenommen (Abb. 11). In jenem Spektralbereich, welcher für den Pyridinkern charakteristisch ist (250 bis 280 mμ), stimmen die beiden Kurven gut überein: Substanz H enthält also wie die Fusarinsäure einen Pyridinkern. Werden die Extinktionen im Maximum der Kurve (270 mμ) verglichen, so ergibt sich, wie auch aus dem Vergleich der spezifischen Aktivitäten, daß die verwendete Fraktion zu 60 % aus Substanz H besteht.

Aus der chemische Charakterisierung ergibt sich, daß Substanz H eine Pyridin-carbonsäure ist. Sie ist vermutlich ein Derivat der α-Picolinsäure, deren Lipophilie gegenüber der Fusarinsäure durch Verkürzung der aliphatischen Seitenkette oder durch Einführung einer polaren Gruppe vermindert worden ist.

d) Biologische Charakterisierung

Mit der gleichen Fraktion, welche für die chemische Charakterisierung verwendet wurde, wurden einige biologische Versuche durchgeführt. Die Konzentration der applizierten Lösung oder die Dosis wurde jeweils auf die effektiv vorhandene Menge Substanz H bezogen: es wurde also berücksichtigt, daß das verwendete Präparat noch 40 % Verunreinigungen enthielt. Es scheint, daß die Verunreinigungen in bezug auf die Wirkung keine Rolle spielten, doch kann dies erst sicher geklärt werden, wenn Substanz H in reiner Form vorliegt.

An junge Tomatensprosse wurde eine Dosis von 300 mg/kg Substanz H in einer Lösung von pH 6,5 und einer Konzentration von $2{,}5 \cdot 10^{-3}$ molar

Tabelle 5

Der Einfluß von Fusarinsäure und Substanz H auf junge Tomatensprosse
Dosis: 300 mg/kg; pH der Lösung 6,5; Konzentration $2{,}5 \cdot 10^{-3}$ molar

Substanz	durchschnittliche Schädigung	
	Blätter	Stengel
Fusarinsäure	3,2	0,8
Substanz H	0,5	0,0

verabreicht. Die Pflanzen wurden nach der üblichen Methode des Welketestes bonitiert. Die Ergebnisse dieses und eines unter gleichen Bedingungen von GÄUMANN, NAEF-ROTH und KOBEL (1952) durchgeführten Versuches sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Durch die Umwandlung der Fusarinsäure zu Substanz H wurde die Toxizität für Tomatensprosse auf einen kleinen Bruchteil vermindert: an den Blättern können noch geringfügige Schäden festgestellt werden, während die Stengel symptomfrei sind.

Bei einigen Pilzen und Bakterien wurde die Wachstumshemmung durch Fusarinsäure und Substanz H verglichen. Filterpapierscheibchen wurden in Lösungen gleicher Konzentrationen getaucht (10 mg/ml), getrocknet und auf Agarplatten gelegt, welche die entsprechenden Organismen enthielten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

Tabelle 6

Durchmesser (mm) der Hemmhöfe, welche durch gleiche Konzentrationen von Fusarinsäure und Substanz H verursacht werden

Organismus	Hemmhöfe durch	
	Fusarinsäure	Substanz H
Candida vulgaris Auct.	18	0
Saccharomyces cerevisiae Hans.	17	12
Escherichia coli (Mig.) Cast.	18	0
Bacillus subtilis Cohn	20	14
Staphylococcus aureus Rosenb.	14	10

Das Wachstum aller geprüften Organismen wird durch Substanz H weniger gehemmt als durch Fusarinsäure. Durch die Umwandlung von Fusarinsäure zu Substanz H wird also ihre Toxizität sowohl für Tomatensprosse wie auch für verschiedene Pilze und Bakterien vermindert. *Fusarium lycopersici* entgiftet also sein eigenes Toxin.

5. KAPITEL

WIRKUNGEN DER FUSARINSÄURE

Neben der Störung der Wasserpermeabilität (BACHMANN 1956) und der Hemmung der Polyphenoloxydase (BOSSI 1959) wirkt die Fusarinsäure als kompetitiver Antagonist eines noch nicht identifizierten essentiellen Metaboliten (KALYANASUNDARAM 1960).

In diesem Kapitel werden hauptsächlich Versuche beschrieben, in denen Stoffe gesucht wurden, welche die toxischen Wirkungen der Fusarinsäure aufheben. Daneben wurde auch der Einfluß der Fusarinsäure auf das Wachstum verschiedener Mikroroganismen untersucht.

1. Einfluß der Fusarinsäure auf das Wachstum verschiedener Mikroorganismen

Hefe (*Saccharomyces cerevisiae* Stamm ETH M 108) wurde in Nährlösung Sa mit unterschiedlichen Fusarinsäurekonzentrationen kultiviert. In Zeitinvervallen von 2 Stunden erfolgte eine Bestimmung der optischen Dichte der Kulturen bei 420 mμ. Die im steilsten Abschnitt der Wachstumskurven erhaltenen Extinktionswerte wurden für die verschiedenen Fusarinsäurekonzentrationen auf die Kontrolle bezogen und so die prozentuale Wachstumshemmung berechnet.

Aus Tabelle 7 geht hervor, daß das Wachstum der Hefe durch eine ungefähr $8 \cdot 10^{-4}$ molare Fusarinsäurelösung auf 50 % reduziert wird. Durch ungefähr die gleichen Fusarinsäurekonzentrationen wird unter gleichen Versuchsbedingungen der Gaswechsel von Hefezellen gehemmt (Reusser und Naef-Roth 1956). CO_2-Abgabe und O_2-Aufnahme bei der Glukoseveratmung und die Glukusevergärung werden bei Fusarinsäurekonzentrationen von $1{,}6 \cdot 10^{-3}$ m, $7 \cdot 10^{-4}$ und 10^{-3} m auf 50 % vermindert (Reusser und Naef-Roth 1956 aus Bossi 1959).

Tabelle 7

Die Wachstumshemmung von Hefe durch Fusarinsäure

Fusarinsäurekonzentration molar	Wachstumshemmung %
10^{-2}	95
10^{-3}	65
10^{-4}	0

Die durch verschiedene Fusarinsäurekonzentrationen hervorgerufene Wachstumshemmung von 5 Mikroorganismen wurde in einem Plattentest festgestellt. Dazu waren die Organismen auf Agarnährböden unterschiedlichen Fusarinsäuregehaltes (Konzentrationsstufen in halben Zehnerpotenzen) ausgestrichen und das Resultat qualitativ ausgewertet worden (Tab. 8).

Für *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* stimmen die hemmenden Fusarinsäurekonzentrationen gut mit jenen überein, welche Gäumann, Naef-

Tabelle 8

Minimale molare Fusarinsäurekonzentrationen, die als Zusätze zu Agarnährböden total wachstumshemmend wirken
0 = kein Wachstum auch ohne Toxinzusatz

Organismus	Nährboden		
	Malzextrakt	Fleischextrakt	synthetisch
Candida vulgaris	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}
Saccharomyces cerevisiae	$10^{-3,5}$	10^{-4}	0
Escherichia coli	$10^{-4,5}$	$10^{-3,5}$	$10^{-3,5}$
Staphylococcus aureus	$10^{-4,5}$	10^{-3}	0
Bacillus subtilis	$10^{-4,5}$	$10^{-3,5}$	10^{-4}

ROTH und KOBEL (1952) und KALYANASUNDARAM (1960) fanden. Für synthetische Medien erhielt KALYANASUNDARAM (1960) etwas kleinere Werte, da er nicht mit einem Plattentest, sondern mit flüssigen Medien arbeitete. Sein Schluß kann jedoch bestätigt werden, indem auch hier gefunden wurde, daß die Wirkung der Fusarinsäure stark vom Testmedium abhängt.

2. Möglichkeit einer Wechselwirkung zwischen Fusarinsäure und Nikotinsäure

Da Fusarinsäure und Nikotinsäure eine ähnliche Struktur besitzen, besteht die Möglichkeit eines kompetitiven Antagonismus zwischen den beiden Stoffen. Die Versuche wurden mit der Methode der gekreuzten Filterpapierstreifen (BONIFAS 1952, JUILLARD 1957) auf Testplatten mit einem Nikotinsäure-bedürftigen Bakterium durchgeführt. Nach den Vorschriften des Difco-Manual (1953) wurden Suspensionen von *Lactobacillus arabinosus* Fred., Peterson & Andersen Stamm ATCC 8014 in einen Nikotinsäure-freien Nährboden eingegossen. In Vorversuchen mit Filterpapierscheibchen erwiesen sich die folgenden Konzentrationen als günstig: Nikotinsäure 10 γ/ml, Fusarinsäure 20 mg/ml. Filterpapierstreifen wurden nun in die entsprechenden Lösungen getaucht und kreuzweise auf Testplatten ausgelegt. Um den Fusarinsäure-haltigen Streifen entstand eine durch Nikotinsäure in keiner Weise beeinflußte Hemmzone (Abb. 12).

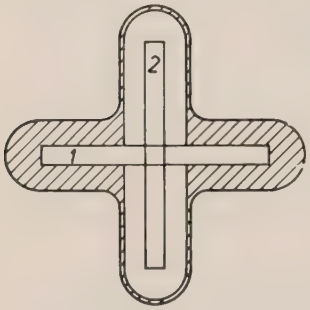


Abb. 12. Bonifas-Test mit Nicotinsäure und Fusarinsäure. Um den nicotinsäurehaltigen Streifen (1) entsteht eine Wachstumszone (schraffiert), welche im Bereiche der Fusarinsäure (Streifen 2) unterbrochen wird

Zum gleichen Schlusse gelangte KALYANASUNDARAM (1960) mit einer turbidimetrischen Methode, obwohl dieses Verfahren den Nachteil geringerer Empfindlichkeit hat, da es im Gegensatz zum BONIFAS-Test mit diskreten Konzentrationsstufen arbeitet. KALYANASUNDARAM stellte fest, daß das Wachstum von *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* in einer synthetischen Nährlösung durch 5 γ/ml Fusarinsäure gerade noch gehemmt wird. Durch Zusätze von Nikotinsäure bis 10 γ/ml wurde die Toxizitätsschwelle der Fusarinsäure nicht heraufgesetzt.

3. Der Einfluß von Schwermetallen auf die Toxizität der Fusarinsäure gegen verschiedene Pilze und Bakterien

KALYANASUNDARAM (1960) fand mit Hilfe der oben dargestellten Methode der gekreuzten Filterpapierstreifen in Hefeextrakt einen Stoff, der die toxische Wirkung der Fusarinsäure auf Testplatten von *Candida vulgaris* kompetitiv aufhebt. Aus dem Verhalten bei der Extraktion kann geschlossen werden, daß der Antagonist eine organische Säure ist. In Papierchromatogrammen in Laufmittel 1 besitzt er einen R_f-Wert von 0,41.

Der Antagonist war nicht nur bei *Candida vulgaris*, sondern auch, allerdings nur in nährstoffarmen Medien, bei *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* und *Ustilago sphaerogena* Burr. ex Ellis et Everh. wirksam.

Außer in Hefeextrakt gelang KALYANASUNDARAM der Nachweis des Antifusarinsäurefaktors in Trypton, N-Z-Amin und Weizenmaische wie auch in Extrakten der Kulturfiltrate von *Colletotrichum fuscum* Laub. und *Fusarium lycopersici*. In unserem Zusammenhange ist vor allem die letzte Herkunft von Interesse, kann man sich doch vorstellen, daß bei der Biosynthese oder der Umwandlung von Fusarinsäure Stoffe entstehen, die dem Toxin strukturell ähnlich sind, jedoch eine ihm entgegengesetzte Wirkung entfalten. Auf Grund dieser Überlegungen wurden Substanz H (ein Umwandlungsprodukt der Fusarinsäure) und eine Reihe synthetischer, der Fusarinsäure strukturell nahestehender Stoffe auf ihre Antifusarinsäurewirkung untersucht.

Im BONIFAS-Test mit *Candida vulgaris* (Malzagarplatten) bestand bei gleichen Konzentrationen (10 mg/ml) zwischen Substanz H und Fusarinsäure kein Antagonismus. Es wurde das gleiche Präparat von Substanz H verwendet, welches für die im letzten Kapitel beschriebenen chemischen und biologischen Charakterisierungen benützt wurde. Ebenso hoben äquimolare Mengen der folgenden Stoffe die Wirkung der Fusarinsäure nicht auf: Pyridin-2, 3, 4-tricarbonsäure, DL-5-Methyl-piperidin-2-carbonsäure-HCl, Pyridin-4-essigsäureamid, Pyridin-4-essigsäure-äthylester-HCl, Isocinchomaronsäure (Pyridin-2,5-dicarbonsäure) und Fusarinsäuremethylbetain.

Im Gegensatz zu diesen und den vielen von KALYANASUNDARAM geprüften definierten Substanzen erwies sich das Eisenchelat der Fusarinsäure als ein sehr aktiver Antifusarinsäurestoff. Die Vermutung lag nahe, daß es sich nicht um eine spezifische Wirkung dieses Eisenchelates handelte, sondern daß Eisen und möglicherweise auch andere Schwermetalle die toxische Wirkung der Fusarinsäure aufheben. Verschiedene Metallverbindungen wurden bei einer Anzahl von Pilzen und Bakterien auf ihre Anti-Fusarinsäurewirkung geprüft (Tab. 9). Als Maß für die Wirksamkeit wurde der Enthemmungsindex gewählt: er gibt an, wieviele Mole Fusarinsäure durch ein Mol des Antagonisten enthemmt werden und ist gleich dem Verhältnis derjenigen molaren Konzentrationen von Fusarinsäure und Antagonist, bei denen die Grenze zwischen Wachstums- und Hemmzone durch das Zentrum der gekreuzten Filterpapierstreifen verläuft.

Aus Tabelle 9 geht hervor, daß ein Grammatom Co, Ni, Cu, Zn oder Mn die Wirkung von wenigen Molen Fusarinsäure bei *Candida vulgaris* aufhebt. Von Nebeneffekten abgesehen, wird die Fusarinsäure hier offenbar im molaren Verhältnis 1 : 2 in ein Chelat überführt, welches für den Organismus nicht mehr toxisch ist. Die Inaktivierung beruht also auf einer reinen in vitro-Chelierung. Bei den Eisenverbindungen ist die Situation ganz anders: hier hebt ein Grammatom Eisen die Wirkung von 100 bis 1000 Molen Fusarinsäure auf. Bei einem solchen Verhältnis kann kein direkter Chelierungseffekt vorliegen, da ein einziges Eisenion unmöglich 100 oder gar 1000 Fusarinsäuremolekeln binden kann.

Tabelle 9

Der Antagonismus zwischen Fusarinsäure und verschiedenen metallhaltigen Verbindungen

Konzentration der Fusarinsäure 10 mg/ml

Testorganismus	Antagonist	Enthemmungsindex
Candida vulgaris	$CoCl_2 \cdot 6\,H_2O$	4,0
	$NiSO_4 \cdot 6\,H_2O$	7,8
	$ZnSO_4 \cdot 7\,H_2O$	7,3
	$MnSO_4 \cdot 4\,H_2O$	1,2
	$CuCl_2 \cdot 2\,H_2O$	2,2
	$MgSO_4$	0
	$FeCl_3 \cdot 6\,H_2O$	90
	$FeSO_4 \cdot 7\,H_2O$	210
	Fe-Gluconat	130
	Fe-Citrat	210
	Ferrioxamin B[1])	970
	Fe-Fusarinsäure	130
	Hefefaktor (KALYANASUNDARAM 1960)	>10
Saccharomyces cerevisiae	Ferrioxamin B	810
Ustilago sphaerogena	Ferrioxamin B[2])	200
Bacillus subtilis	$FeCl_3 \cdot 6\,H_2O$	0
	Ferrioxamin B	0
Escherichia coli	$FeCl_3 \cdot 6\,H_2O$	0
	Fe-Gluconat	0
	Fe-Fusarinsäure	0
	Ferrioxamin B	0

[1]) Ein Sideramin, eine organische Eisenverbindung mikrobiellen Ursprungs (BICKEL, GÄUMANN, KELLER-SCHIERLEIN, PRELOG, VISCHER, WETTSTEIN und ZÄHNER 1960; ZÄHNER, HÜTTER und BACHMANN 1960).

[2]) Die Wirkung der Fusarinsäure wird hier nur in einem sehr engen Konzentrationsbereich aufgehoben. Der Index ist so berechnet, als würde sich die Begrenzungslinie zwischen Hemm- und Wachstumszone bis ins Achsenkreuz fortsetzen.

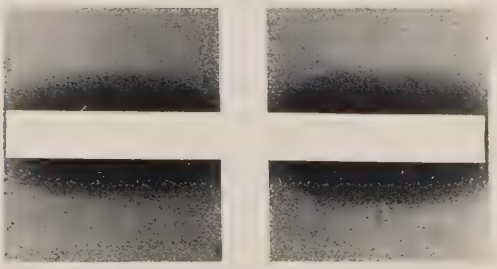


Abb. 13. Aufhebung der Toxizität der Fusarinsäure (horizontaler Streifen; 10 mg/ml) durch Ferrioxamin B (senkrechter Streifen: 100 γ/ml). Testorganismus *Candida vulgaris*. Natürliche Größe

Die Befunde können so erklärt werden, daß die Fusarinsäure spezifisch in den Eisenstoffwechsel eingreift.

Wie aus Abbildung 13 ersichtlich ist, stellt die Begrenzungslinie zwischen den Wachstums- und Hemmzonen eine Gerade dar. Daraus geht hervor, daß der Antagonismus innerhalb des auf der Platte vorhandenen Konzentrationsgefälles kompetitiv ist (JUILLARD 1957). Nach

der Definition von WOOLLEY (1952) kann aber im vorliegenden Falle trotzdem nicht von einem kompetitiven Antagonismus gesprochen werden:

Der Antagonismus kann überhaupt nicht in einem weiten Konzentrationsbereich untersucht werden, da die verwendeten Organismen nur auf hohe Toxinkonzentrationen ansprechen und die Löslichkeit des Toxines in Wasser beschränkt ist.

Die beiden Antagonisten sind strukturell nicht ähnlich.

Ferrioxamin B weist bei *Candida vulgaris* einen Enthemmungsindex von ungefähr 1000 auf, während er für alle übrigen Eisenverbindungen zwischen 100 und 200 liegt. Ferrioxamin B wird wie andere Sideramine und im Gegensatz zu anorganischem Eisen von Mikroorganismen direkt aufgenommen (BICKEL, GÄUMANN, KELLER-SCHIERLEIN, PRELOG, VISCHER, WETTSTEIN und ZÄHNER 1960). Anorganisches Eisen und wahrscheinlich auch dasjenige des Gluconats, Citrats usw. muß vor der Aufnahme zu einem spezifischen Chelat verbunden werden und kann daher nicht sehr rasch in den mikrobiellen Stoffwechsel eingreifen. Auf diese Weise läßt sich der Unterschied zwischen den Enthemmungindizes von Ferrioxamin B und den übrigen Eisenverbindungen erklären.

Weiterhin zeigt Tabelle 9 die unterschiedliche Wirkung von Eisenverbindungen bei verschiedenen Mikroorganismen. *Saccharomyces cerevisiae* reagiert auf Ferrioxamin B wie *Candida vulgaris*. Bei *Ustilago sphaerogena* wird die Wirkung der Fusarinsäure nur im Bereiche der niedrigsten noch wirksamen Konzentration aufgehoben. Das bedeutet, daß der Wirkungsmechanismus der Fusarinsäure hier nur zu einem kleinen Teil in einer Störung des Eisenstoffwechsels besteht. Bei *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli* schließlich hebt keine der geprüften Eisenverbindungen die Wirkung der Fusarinsäure auf, obwohl bekannt ist, daß Ferrioxamin B in Gram-positive Bakterien wie *Bacillus subtilis* eindringt. Mindestens bei *Bacillus subtilis* beruht also die toxische Wirkung der Fusarinsäure nicht auf einem Eingriff in den Eisenstoffwechsel.

Die Ergebnisse dieses Kapitels bestätigen die Pleiotropie der Fusarinsäure. Auf der Ebene der einzelnen Zelle kann mindestens bei einigen Pilzen zu den bereits bekannten Wirkungen ein spezifischer Eingriff in den Eisenstoffwechsel kommen. Wie weit dies auch für Phanerogamen zutrifft, ist noch nicht bekannt. Die zur Zeit in Gang befindlichen Untersuchungen deuten zwar auf einen solchen Eingriff hin, doch lassen sich infolge experimenteller Schwierigkeiten noch keine eindeutigen Schlüsse ziehen.

DISKUSSION

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß sowohl *Fusarium lycopersici* als auch *Gibberella Fujikuroi* das Toxin rasch verändern: bereits nach zwei Stunden sind Umwandlungsprodukte nachweisbar, und innerhalb weniger Tage verläuft die Umwandlung fast quantitativ. Die Fusarinsäure ist also kein Ausscheidungsprodukt, sondern sie ist weiteren Veränderungen in-

nerhalb des Stoffwechsels unterworfen. Zudem konnte SANDHU (1959) nachweisen, daß *Gibberella Fujikuroi* Glukose in wenigen Stunden zu einem beträchtlichen Teil in Fusarinsäure umwandelt. Da also sowohl der Aufbau der Fusarinsäure wie auch ihr Abbau rasch verlaufen, stellt sich zwischen den beiden Vorgängen ein Gleichgewicht ein, dessen jeweilige Resultante sich in der Kurve des Fusarinsäuregehalts des Kulturfiltrates widerspiegelt. Diese Kurve kann unter verschiedenen äußeren Bedingungen und bei verschiedenen Pilzstämmen unterschiedlich verlaufen, da Auf- und Abbaureaktionen des Toxins kaum durch die gleichen Faktoren kontrolliert werden. Bei den beiden in unseren Versuchen verwendeten Stämmen war im Kulturfiltrat des einen viel, im andern wenig Fusarinsäure nachweisbar, während die Umwandlungsrate im ersten Falle kleiner war als im zweiten. Man kann sich vorstellen, daß beide Stämme ähnliche Mengen Fusarinsäure bilden und nur ihr unterschiedlicher Abbau eine unterschiedliche Produktion vortäuscht.

Fusarinsäure wird sowohl von *Fusarium lycopersici* als auch von *Gibberella Fujikuroi* in mindestens drei verschiedene Stoffe umgewandelt, von denen der eine in weitaus größter Menge entsteht. Dieser Stoff, Substanz H, konnte bis jetzt auf 60 % Reinheit angereichert werden. Auf Grund des Verhaltens bei der Extraktion, im Papierchromatogramm und an einem Ionenaustauscher ergibt sich, daß Substanz H eine organische Säure darstellt, die wesentlich hydrophiler ist als die Fusarinsäure. Zudem zeigt ihr UV-Absorptionsspektrum die für den Pyridinkern typische Kurve. Auf Grund dieser Tatsachen liegt die Vermutung nahe, daß sich Substanz H durch Einführung einer polaren Gruppe oder durch teilweise oder vollständige Oxydation der aliphatischen Seitenkette von der Fusarinsäure ableiten läßt, wobei das Grundgerüst der α-Picolinsäure erhalten bliebe. Dehydrofusarinsäure tritt bei *Fusarium lycopersici* (STOLL, RENZ und GÄUMANN 1957) und *Gibberella Fujikuroi* (STOLL und RENZ 1957) zeitlich erst nach der Fusarinsäure auf und könnte somit durch Dehydrierung der Fusarinsäure entstanden sein. Für den Abbau der Fusarinsäure kann man also folgende Hypothese aufstellen: sie wird dehydriert, durch Anlagerung von Wasser zum Alkohol umgewandelt und durch weitere Oxydation in eine Dicarbonsäure überführt. Substanz H könnte mit der so entstandenen Dicarbonsäure identisch sein. Es ist jedoch zu beachten, daß diese Formulierung eine Hypothese ist, die experimentell zu prüfen ist.

Ähnliche ω-Oxydationen aliphatischer Verbindungen sind von Fettsäuren bekannt, deren Carboxylgruppe z. B. durch Veresterung vor der normalen β-Oxydation geschützt ist. Nach der ω-Oxydation kann der Ester unter Umständen gespalten und als Dicarbonsäure ausgeschieden werden (LEUTHARDT 1957).

Obwohl Substanz H noch nicht in reiner Form vorliegt, wurden einige biologische Tests mit ihr ausgeführt; Modifikationen der Wirkung durch Verunreinigungen wurden vorläufig nicht berücksichtigt. Werden an junge Tomatensprosse 300 mg/kg Fusarinsäure in einer Lösung von pH 6,5 verabreicht, so werden die Pflanzen sehr stark geschädigt: die Blätter sind schlaff und weisen viele Flecke auf, die Blattränder sind eingerollt, und der Stengel

ist leicht eingeschnürt (Gäumann, Naef-Roth und Kobel 1952). Bei gleichem pH der Lösung und gleicher Dosis werden Tomatensprosse durch Substanz H praktisch nicht geschädigt, nur an wenigen Blättern können einzelne Flecke beobachtet werden. Daraus folgt, daß die Umwandlung der Fusarinsäure durch *Fusarium lycopersici* zu einer Substanz führt, die für Tomatensprosse kaum mehr toxisch ist. Für verschiedene Pilze und Bakterien ist die Situation ähnlich: werden Fusarinsäure und Substanz H in gleicher Konzentration getestet, so ist die Hemmwirkung von Substanz H auf das Wachstum wesentlich geringer als diejenige der Fusarinsäure. Die Fusarinsäure wird also durch die sie bildenden Pilze selber umgewandelt und dabei entgiftet. Eine solche Entgiftung von Toxinen durch die sie bildenden Organismen konnte unseres Wissens bisher von keinem anderen pflanzlichen Krankheitserreger nachgewiesen werden.

Im Erdboden wird die Fusarinsäure in beträchtlichen Mengen gebildet und ist wahrscheinlich wegen ihrer antibiotischen Eigenschaften für die Ausbreitung der sie bildenden Organismen von Bedeutung (Kalyanasundaram 1958). Nun hat sich aber gezeigt, daß nicht nur *Fusarium lycopersici* und *Gibberella Fujikuroi*, sondern auch die meisten andern untersuchten Pilze, die selber keine Fusarinsäure bilden, das Toxin umwandeln können, wobei wahrscheinlich Substanz H gebildet wird. Als im Boden wirksames Antibiotikum hat die Fusarinsäure an Bedeutung verloren, wenn Pilzhyphen ihre nächste Umgebung entgiften können.

Kalyanasundaram (1960) konnte in Hefeextrakt eine organische Säure nachweisen, welche die Toxizität der Fusarinsäure bei *Candida vulgaris* kompetitiv aufhebt. Ein Mol des unbekannten Stoffes hebt die Wirkung von mindestens 10 Molen Fusarinsäure auf. Die qualitativ gleiche, quantitativ aber viel stärkere Wirkung erzielten wir mit verschiedenen anorganischen Eisenverbindungen. Am aktivsten war dabei eine biogene Eisenverbindung, das Ferrioxamin B, welches wie die Ferrichrome zu den Sideraminen gehört (Bickel, Gäumann, Keller-Schierlein, Prelog, Vischer, Wettstein und Zähner 1960; Zähner, Hütter und Bachmann 1960); ein Mol Ferrioxamin B antagonisiert die Wirkung von 1000 Molen Fusarinsäure. Sowohl der Hefeextraktstoff wie auch das Ferrioxamin B scheinen die Toxizität der Fusarinsäure in Tomatensprossen zu vermindern. Diese Tatsachen führen zu drei Folgerungen:

1. Die im Hefeextrakt gefundene organische Säure ist möglicherweise eine Eisenverbindung. Saure organische Eisenverbindungen mikrobiellen Ursprungs sind bereits bekannt, so das von Garibaldi und Neilands (1955) aus *Ustilago sphaerogena* isolierte Ferrichrom A.

2. Die Fusarinsäure greift spezifisch in den Eisenstoffwechsel ein. Eine Aufhebung der Toxizität der Fusarinsäure durch Eisenverbindungen könnte durch extrazelluläre Chelierung nur dann erklärt werden, wenn je zwei Fusarinsäuremolekeln ein Eisenatom nötig wäre, was für andere Schwermetalle tatsächlich zutrifft. Man kann sich folgenden intrazellulären Wirkungsmechanismus vorstellen: die Fusarinsäure inaktiviert eine in sehr kleinen Mengen notwendige Eisenverbindung. Zwischen der Fusarinsäure und dieser notwen-

digen Eisenverbindung entsteht eine molekulare Verbindung, die im Gleichgewicht mit den freien Komponenten steht, wobei das Gleichgewicht stark auf der Seite der freien Fusarinsäure liegt. Durch äußere Zuführung einer kleinen Menge Eisen wird das Gleichgewicht so verschoben, daß die notwendige Eisenverbindung wieder in genügender Menge neu entstehen kann. Der Unterschied in der Wirkung von Eisen und anderen Schwermetallen kann kaum durch verschiedene Eindringung erklärt werden: es ist höchst unwahrscheinlich, daß alle Eisenverbindungen um ein Vielfaches rascher aufgenommen werden als die übrigen Schwermetalle. Zudem kann die wirksamste Eisenverbindung, das Ferrioxamin B, in Zellen (z. B. Gram-positiver Bakterien) eindringen, reagiert aber in vitro im Gegensatz zu anorganischen Eisenverbindungen nicht mit der Fusarinsäure.

3. Falls Fusarinsäure und Eisenverbindungen in Tomatenpflanzen nicht nur in qualitativer, sondern auch in quantitativer Hinsicht in einer ähnlichen Wechselwirkung stehen wie bei *Candida vulgaris*, so ergäbe sich eine Möglichkeit zur Therapie. Durch Applikation von Eisenverbindungen könnte an infizierten Pflanzen eine weitere, durch Fusarinsäure bedingte Schädigung unterbunden werden. Für ein anderes chelierendes Welketoxin, das Lycomarasmin, konnten GÄUMANN, BACHMANN und HÜTTER (1957) bereits zeigen, daß zwischen Eisengehalt und Toxinempfindlichkeit ein enger Zusammenhang besteht. Mit Fusarinsäure wurden in dieser Richtung ebenfalls einige Versuche durchgeführt, aus denen jedoch infolge experimenteller Schwierigkeiten noch kein eindeutiger Schluß gezogen werden kann.

KALYANASUNDARAM (1960) konnte einen Antagonisten der Fusarinsäure nicht nur in Hefeextrakt, sondern auch in Fraktionen des Kulturfiltrates von *Fusarium lycopersici* nachweisen. Der Antagonist verhielt sich sowohl bei der Extraktion wie auch in der Papierchromatographie ähnlich wie die in unseren Versuchen als Umwandlungsprodukt der Fusarinsäure nachgewiesene Substanz H. Da Substanz H der Fusarinsäure chemisch nahesteht und kompetitive Antagonisten meistens ähnliche Strukturen besitzen, lag die Hypothese, Substanz H sei mit dem gesuchten Antagonisten identisch, nahe. Es hat sich jedoch gezeigt, daß Substanz H auch in sehr hohen Konzentrationen die toxische Wirkung der Fusarinsäure gegen *Candida vulgaris* nicht aufhebt. Hingegen ist es denkbar, daß, wenn Substanz H tatsächlich ein Derivat der α-Picolinsäure ist, ihr Eisenchelat im fraktionierten Kulturfiltrat von *Fusarium lycopersici* die Wirkung der Fusarinsäure antagonisiert. Da aber das Eisen allein für die Wirksamkeit verantwortlich wäre und das Picolinsäurederivat nur als Eisenvektor funktionieren würde, könnte nicht von einem kompetitiven Antagonismus gesprochen werden, da die beiden eigentlichen Antagonisten, Fusarinsäure und Eisen, chemisch keineswegs ähnlich sind (WOOLLEY 1952).

Nicht nur von der Fusarinsäure, sondern auch von der α-Picolinsäure ist bekannt, daß Schwermetalle ihre toxische Wirkung aufheben. Die durch α-Picolinsäure verursachte Wachstumshemmung von *Streptobacterium plantarum* kann durch äquimolare Mengen von Zink-, Eisen- oder Mangansalzen aufgehoben werden (MÖLLER und BIRKOFER 1942). Die Wirkung von Eisen

ist aber hier im Gegensatz zu den Versuchen mit Fusarinsäure nicht stärker als diejenige anderer Schwermetalle.

Wirt und Erreger bilden bei Infektionskrankheiten von Tier und Pflanze eine enge Lebensgemeinschaft. Der Stoffwechsel des Erregers verändert einerseits die Lebensvorgänge des Wirtes, und andererseits bestimmt die physiologische Lage des Wirtes die weitere Entwicklung des Erregers. Unsere bisher angestellten Überlegungen für die Welkekrankheit der Tomate haben nur den einen Partner der Wirt-Erreger-Gemeinschaft als aktiv handelnd betrachtet, den Erreger. Indessen löst das zur Diskussion stehende Toxin nicht nur Reaktionen der Pflanze aus, sondern es wird auch selber durch die Wirtspflanze weiter verändert. Chemisch geklärt wurden durch SANWAL (1956) und KLUEPFEL (1957) die „Decarboxylierung" der Fusarinsäure und ihre Umwandlung in das wenig giftige Amidmethylat. Auf eine eigentliche Decarboxylierung wurde geschlossen, weil markiertes Kohlendioxyd nach Verabreichung von Carboxyl-markierter Fusarinsäure an Tomatensprosse gefunden wurde. Hier hat sich nun gezeigt, daß $^{14}CO_2$ in ungefähr der gleichen Menge ausgeschieden wird, wenn den Tomatensprossen eine im Pyridinkern markierte Fusarinsäure appliziert wird. Zudem konnte Butylpyridin, das erwartete Endprodukt der Decarboxylierung, nicht als Umwandlungsprodukt der Fusarinsäure nachgewiesen werden. Diese Befunde führen zum Schluß, daß ein Teil der an Tomatensprosse applizierten Fusarinsäure auf noch unbekanntem Wege in kleine Bruchstücke gespalten und veratmet wird. Hingegen findet eine eigentliche Decarboxylierung der Fusarinsäure nicht statt. Die Fusarinsäure ist nicht das einzige Beispiel für die Veratmung eines Giftstoffes: Benzol z. B. wird im tierischen Organismus, vor allem in der Leber, über Muconsäure zu Kohlendioxyd abgebaut (FISHMAN 1956).

Die Decarboxylierung der Fusarinsäure erweckte besonderes Interesse, weil Butylpyridin im Plasmolysetest weit aktiver ist als Fusarinsäure (BACHMANN 1956). Da die vermutete Umwandlung aber nicht stattfindet, muß die Hypothese, nach welcher Butylpyridin wesentlich am Zustandekommen der Schädigung durch Fusarinsäure beteiligt sei, fallen gelassen werden.

Eine Identifizierung der beiden hydrophilen Umwandlungsprodukte, welche in Tomatensprossen aus Fusarinsäure entstehen, ist infolge ihrer geringen Konzentration nicht gelungen. Hingegen steht fest, daß sich der eine dieser beiden Stoffe im Papierchromatogramm gleich verhält wie Substanz H, welche in Kulturen von *Fusarium lycopersici* das Hauptumwandlungsprodukt der Fusarinsäure darstellt. Es bleibt zu hoffen, daß der Stoffwechsel der Fusarinsäure in der Wirtspflanze auf indirektem Wege über Umwandlungen durch Pilze weiter geklärt werden kann.

Zusammenfassung

1. Rund 10 % der an Tomatensprosse verabreichten Fusarinsäure werden in kleine Bruchstücke gespalten und veratmet.

2. Als Zwischenprodukt des Abbaus konnte kein Butylpyridin nachgewiesen werden.

3. Neben den vier von SANWAL (1956) und KLUEPFEL (1957) gefundenen Umwandlungsprodukten der Fusarinsäure in Tomatensprossen werden noch mindestens zwei weitere Stoffe in geringen Mengen gebildet.

4. In Homogenaten von Tomatensprossen konnte keine Umwandlung der Fusarinsäure nachgewiesen werden.

5. Verschiedene Pilze wandeln die Fusarinsäure chemisch um. Bei den Fusarinsäure bildenden Pilzen ist die Umwandlungsrate größer als bei jenen, welche das Toxin nicht bilden.

6. Die Umwandlung der Fusarinsäure erfolgt bei *Gibberella Fujikuroi* und *Fusarium lycopersici* in gleicher Weise. Es entstehen mindestens drei verschiedene Stoffe. Einer davon, das Hauptumwandlungsprodukt, tritt innerhalb weniger Tage in Mengen von rund 60 % der verabreichten Fusarinsäure auf.

7. Chemisch ist das Hauptumwandlungsprodukt eine Pyridincarbonsäure, die hydrophiler ist als die Fusarinsäure. Wahrscheinlich handelt es sich wie bei der Fusarinsäure um ein Derivat der α-Picolinsäure.

8. Das Hauptumwandlungsprodukt ist sowohl für Tomatensprosse wie auch für verschiedene Pilze und Bakterien weniger toxisch als Fusarinsäure.

9. Chelate der Fusarinsäure mit Eisen, Kupfer und Kobalt können von den freien Komponenten papierchromatographisch unterschieden werden. In geringer Menge kann ihre Anwesenheit in Extrakten von Pilzkulturen und Tomatensprossen, welche mit Fusarinsäure behandelt worden waren, nachgewiesen werden.

10. Die Toxizität der Fusarinsäure gegen *Candida vulgaris* wird durch Kobalt-, Kupfer-, Nickel-, Zink- und Mangansalze kompetitiv aufgehoben. Dabei inaktiviert ein Grammatom Schwermetall wenige Mole Toxin.

11. Eisenverbindungen kompensieren ebenfalls die Toxizität der Fusarinsäure gegen *Candida vulgaris*. Sie sind jedoch wesentlich effektvoller als Verbindungen der anderen Schwermetalle. Ein Grammatom Eisen hebt die Wirkung von 100 bis 1000 Molen Fusarinsäure kompetitiv auf.

12. Es wurde geschlossen, daß die Fusarinsäure in den Eisenstoffwechsel eingreift.

Summary

1. Approximately 10 % of the fusaric acid applied to tomato shoots is broken down into small fragments and excreted as carbon dioxide.

2. No butylpyridine has been found as an intermediate of the breakdown.

3. Apart from the four metabolites of fusaric acid detected in tomato shoots by SANWAL (1956) and KLUEPFEL (1957), two further substances are formed in small quantities.

4. No chemical conversion of fusaric acid has been found in homogenates of tomato shoots.

5. Numerous fungi are capable of metabolizing fusaric acid. Fungi producing fusaric acid convert it more rapidly than those which do not.

6. With *Fusarium lycopersici* and *Gibberella Fujikuroi*, the metabolism follows the same pattern. Within a few days, approximately 70 % of the fusaric acid applied to the fungi is converted into three metabolites, one of which is formed in a predominating amount.

7. The principal metabolite, like fusaric acid, is a pyridine-carboxylic acid, probably also a derivate of α-picolinic acid. In comparison with fusaric acid, this compound is more easily soluble in water.

8. For tomato shoots and various microorganisms, the principal metabolite is less toxic than fusaric acid.

9. On paper chromatographs, chelates of fusaric acid with iron, copper and cobalt can be distinguished from the free components. Small amounts of chelates are found in extracts of fungi and tomato shoots treated with fusaric acid.

10. The toxicity of fusaric acid to *Candida vulgaris* can be reversed competitively by salts of cobalt, copper, nickel, zinc and manganese. One atom of the heavy metals antagonises only a few molecules of the toxin.

11. Iron compounds also counteract the toxicity of fusaric acid to *Candida vulgaris*, and are far more effective than compounds of other heavy metals. One atom of iron competitively reverses the action of 100 to 1000 molecules of fusaric acid.

12. It is concluded that fusaric acid interferes with the iron metabolism.

Literaturverzeichnis

Aronoff, S., 1956: Techniques of radiobiochemistry. Iowa State College Press, Iowa, 228 S.

Bachmann, E., 1956: Der Einfluß von Fusarinsäure auf die Wasserpermeabilität von pflanzlichen Protoplasten. Phytopath. Z. **27**, 255—288.

Bickel, H., E. Gäumann, W. Keller-Schierlein, V. Prelog, E. Vischer, A. Wettstein und H. Zähner, 1960: Über eisenhaltige Wachstumsfaktoren, die Sideramine, und ihre Antagonisten, die eisenhaltigen Antibiotika Sideromycine. Experientia **16**, 129—133.

Biland, H., F. Lohse und E. Hardegger, 1960: Welkestoffe und Antibiotika. 22. Verwendung radioaktiver Fusarinsäure und Synthese von Fusarinsäure — (2,5^1 — ^{14}C). Helv. chim. Acta **43**, 1436—1440.

Bonifas, V., 1952: Détermination de l'association synergique binaire d'antibiotes et de sulfamides. Experientia **8**, 234—235.

Bossi, R., 1959: Über die Wirkung der Fusarinsäure auf die Polyphenoloxydase. Phytopath. Z. **37**, 273—316.

Bush, I. E., 1952: Methods of paper chromatography of steroids applicable to the study of steroids in mammalian blood and tissue. Biochem. J. **50**, 370—378.

CALVIN, M., C. HEIDELBERGER, J. C. REID, B. M. TOLBERT and P. E. YANKWICH, 1949: Isotopic Carbon. Wiley, New York, 376 S.

DEUEL, H., 1954: Über Störungen des Spurenelementhaushaltes der Pflanzen durch Welketoxine. Phytopath. Z. **21**, 337—348.

Difco Manual of dehydrated culture media and reagents for microbiological and clinical laboratory procedures. 1935. 9. Aufl. Difco Laboratories, Detroit, 350 S.

DIMOND, A. E., and P. E. WAGGONER, 1953: The cause of epinastic symptoms in *Fusarium* wilt of tomatoes. Phytopathology **43**, 663—669.

FAIRES, R. A., and B. H. PARKS, 1958: Radioisotope laboratory techniques. Newnes, London. 244 S.

FISHMAN, W. H., 1956: Metabolism of drugs and other organic chemicals. Ann. Rev. Biochemistry **25**, 659—684.

GARIBALDI, J. A., and J. B. NEILANDS, 1955: Isolation and properties of ferrichrom A. J. Am. Chem. Soc. **77**, 2429—2430.

GÄUMANN, E., 1957: Über Fusarinsäure als Welketoxin. Phytopath. Z. **29**, 1—44.

— —, 1958: Über die Wirkungsmechanismen der Fusarinsäure. Phytopath. Z. **32**, 359—398.

— —, und E. BACHMANN, 1957: Über den Einfluß der Ernährung auf die Schädigung der Wasserpermeabilität der Protoplasten durch Fusarinsäure. Phytopath. Z. **31**, 1—12.

— —, — — und R. HÜTTER, 1957: Über den Einfluß der Eisenernährung auf die Lycomarasmin-Empfindlichkeit der Tomatenpflanzen. Phytopath. Z. **30**, 87—105.

— —, und W. LOEFFLER, 1957: Über die Wirkung von Fusarinsäure auf die Wasserpermeabilität der Markzellen von Tomatenpflanzen. Phytopath. Z. **28**, 319—328.

— —, ST. NAEF-ROTH und H. KOBEL, 1952: Über Fusarinsäure, ein zweites Welketoxin des *Fusarium lycopersici* Sacc. Phytopath. Z. **20**, 1—38.

— —, — — und G. MIESCHER, 1950: Untersuchungen über das Lycomarasmin. Phytopath. Z. **16**, 257—288.

— —, — —, P. REUSSER und A. AMMANN, 1952: Über den Einfluß einiger Welketoxine und Antibiotica auf die osmotischen Eigenschaften pflanzlicher Zellen. Phytopath. Z. **19**, 160—220.

— —, CH. STOLL und H. KERN, 1953: Über Vasinfuscarin, ein drittes Welketoxin des *Fusarium lycopersici* Sacc. Phytopath. Z. **20**, 345—347.

HARDEGGER, E., 1957: Einführung in das organisch-chemische Praktikum. Verlag Vereinigung Chemiestudierender an der ETH, Zürich, 130 S.

— —, und E. NIKLES, 1956: Welkestoffe und Antibiotika. 16. Fusarinsäure — (carboxyl — ^{14}C) und quaternäre Derivate der Fusarinsäure. Helv. Chim. Acta **39**, 223—229.

HOHL, H. R., 1959: Toxine. In LINSKENS, H. F.: Papierchromatographie in der Botanik. S. 315—326. 2. Aufl. Springer, Berlin, 408 S.

JUILLARD, M., 1957: Über die Cobalamine einer Mutante von *Bacillus megaterium* De Bary. Zbl. Bakt. Abt. II, **110**, 701—727.

KALYANASUNDARAM, R., 1958: Production of fusaric acid by *Fusarium lycopersici* Sacc. in the rhizosphere of tomato plants. Phytopath. Z. **32**, 25—34.

— —, 1960: Studies on an antagonist of the phytotoxin fusaric acid. Phytopath. Z. **38**, 217—244.

— —, und R. BRAUN, 1958: Über die Probleme der Baumwollwelke. Phytopath. Z. **33**, 321—340.

Kluepfel, D., 1957: Über die Biosynthese und die Umwandlungen der Fusarinsäure in Tomatenpflanzen. Phytopath. Z. **29**, 349—379.

König, W., 1904: Über eine neue, vom Pyridin derivierende Klasse von Farbstoffen. J. prakt. Chem. **69**, 105—137.

Leuthardt, F., 1957: Lehrbuch der physiologischen Chemie. De Gruyter, Berlin, 908 S.

Möller, E. F., und L. Birkofer, 1942: Gibt es Antagonisten der Nicotinsäure bei *Proteus vulgaris* und *Streptobacterium plantarum*? Ber. Dtsch. Chem. Ges. **75**, 1118—1126.

Munier, R., et M. Macheboeuf, 1949: Microchromatographie de partage des alkaloides et de diverses bases azotées biologiques. Bull. Soc. Chem. Biol. **31**, 1144—1162.

Neilands, J. B., 1957: Some aspects of microbial iron metabolism. Bact. Rev. **21**, 101—111.

Page, O. T., 1959: Fusaric acid in banana plants infected with *Fusarium oxysporum* f. *cubense*. Phytopathology **49**, 230.

Paquin, R., and E. R. Waygood, 1957: The effect of *Fusarium* toxins on the enzymic activity of tomato hypocotyl mitochondria. Canad. J. Bot. **35**, 207—218.

Plattner, Pl. A., W. Keller und A. Boller, 1954: Welkestoffe und Antibiotika. 15. Konstitution und Synthese der Fusarinsäure. Helv. chim. Acta **37**, 1379—1392.

Reusser, P., und St. Naef-Roth, 1956: Über den Einfluß der Fusarinsäure auf den Gaswechsel von *Saccharomyces cerevisiae* Hans. Phytopath. Z. **26**, 273—296.

Sandhu, R. S., 1959: Studies on the biogenesis of fusaric acid. Phytopath. Z. **37**, 33—60.

Sanwal, B. D., 1956: Investigations on the metabolism of *Fusarium lycopersici* Sacc. with the aid of radioactive carbon. Phytopath. Z. **25**, 333—384.

Scheffer, R. P., and J. C. Walker, 1953: The physiology of *Fusarium* wilt in tomato. Phytopathology **43**, 116—125.

Stoll, Ch., und J. Renz, 1957: Über den Fusarinsäure- und Dehydrofusarinsäurestoffwechsel von *Gibberella fujikuroi* (Saw.) Woll. Phytopath. Z. **29**, 380—387.

— —, — — und E. Gäumann, 1957: Über die Bildung von Fusarinsäure und Dehydrofusarinsäure durch das *Fusarium lycopersici* Sacc. in saprophytischer Kultur. Phytopath. Z. **29**, 388—394.

Tamari, K., and J. Kaji, 1952, 1953: Studies on the mechanism of injurious action of fusarinic acid on plant growth. 1—8. J. agr. chem. soc. Japan **27**, 144—147, 147—150, 159—161.

Van Slyke, D. D., J. Plazin and J. R. Weisiger, 1951: Reagents for the Van Slyke-Folch wet carbon combustion. J. biol. chem. **191**, 299—304.

Wacker, A., 1956: Papierchromatographie. R_f-Werte und Nachweisverfahren der wichtigsten Verbindungen. In Rauen, H. M.: Biochemisches Taschenbuch, S. 1132—1140. Springer, Berlin, 1332 S.

Weintraub, R. L., J. W. Brown, M. Fields and J. Rohan, 1952: Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. $C^{14}O_2$-production by bean plants treated with labelled 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Plant Physiol. **27**, 293—301.

Williams, R. T., 1949: Detoxication mechanisms. 2. Aufl. Wiley, New York, 288 S.

Woolley, D. W., 1952: A study of antimetabolites. Wiley, New York, 269 S.

Yabuta, T., K. Kambe, and T. Hayashi, 1934: Biochemistry of the bakanaë-fungus. I. Fusarinic acid, a new product of the bakanaë-fungus. J. agr. chem. soc. Japan **10**, 1059—1068; zit. nach Chem. Abstr. **29**, 1132, 1937.

Zähner, H., R. Hütter und E. Bachmann, 1960: Stoffwechselprodukte von Actinomyceten. 23. Zur Kenntnis der Sideromycinwirkung. Arch. Mikrobiol., **36**, 325.

Aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Braunschweig

Über die Beeinflussung des Infektionserfolges an Blättern durch Virushemmstoffe[1])

Von

E. Köhler

Mit 16 Abbildungen

Nach unseren gegenwärtigen Kenntnissen wird der Infektionserfolg bei der Impfeinreibung von Testblättern durch mancherlei Stoffe beeinflußt, die dem Inokulat (der „Impflösung") zugesetzt werden oder die, wenn es sich um Pflanzensäfte handelt, von vornherein darin enthalten sein können (u. a. Bawden 1954, W. Bartels 1955, Dale u. Thornberry 1955, Ragetli 1957). Die Wirkung auf die Infektion kann eine hemmende oder eine fördernde sein; im ersten Falle spricht man von Hemmstoffen, im zweiten von Fördererstoffen („augmenters", Benda 1956, Blasczcak, Ross u. Larson 1959). Die Hemmwirkung kann erstens darauf beruhen, daß der betreffende Stoff das Virus schon im Inokulat inaktiviert, wobei man eine reversible und eine irreversible Inaktivierung zu unterscheiden hat. Sie kann aber auch zweitens eine Folge davon sein, daß das Haften der Infektion vereitelt wird, wobei es sich primär um eine Beeinflussung des geimpften Blattes handelt. Drittens ist eine weitere Beeinflussung dadurch möglich, daß die Vermehrung des Virus nach angegangener Infektion gehemmt ist. Die Abgrenzung der verschiedenartigen Wirkungen ist in praxi oft schwierig und wird besonders dann zu einem Problem, wenn ein und derselbe „Hemmstoff" in verschiedener Richtung wirksam ist.

Die folgenden Versuche wurden in der Absicht unternommen, Anhaltspunkte für eine bessere Beurteilung der ihrer Natur nach noch recht wenig bekannten Hemmungsmechanismen zu gewinnen.

MATERIAL UND METHODE

Zu allen Versuchen wurden infektiöse Blattsäfte des türkischen Tabaks, Sorte „Bashi Baghli gestielt", verwendet, weil der Saft dieser Sorte nach eigener Erfahrung keine nennenswerte Hemmwirkung auszuüben scheint (Köhler 1957). Die Pflanzen wurden im Jugend-

[1]) Die Untersuchungen wurden durch eine Sachbeihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft ermöglicht, wofür der Verfasser seinen Dank ausspricht.

stadium mit dem betreffenden Virusisolat infiziert. Die durch Auspressen im Porzellanmörser gewonnenen infektiösen Blattsäfte wurden durch Glaswolle filtriert und ungereinigt und stets frisch verwendet. Von den zu prüfenden Hemmstoffen bzw. hemmstoffhaltigen Säften wurden Verdünnungsreihen hergestellt. Die einzelnen Verdünnungsstufen[1]) wurden mit dem infektiösen Saft zu gleichen Teilen gemischt. ½ bis 1 Std. danach wurden die Gemische auf die Testblätter mit dem Glasspatel, in der Regel ohne Abrasiv, aufgerieben; gleich nach dem Abreiben wurden die Blätter unter dem Strahl der Wasserleitung abgespült. Die ganze, für den einzelnen Versuch erforderliche Menge Testblätter etwa gleicher Größe und Beschaffenheit wurde kurz zuvor abgeschnitten und gut durchgemischt, um die stets vorhandenen Unterschiede in der Anfälligkeit der Blätter nach Möglichkeit auszugleichen. Nach dem Impfen kamen die Blätter in feuchtgehaltene Petrischalen, die bei künstlichem oder natürlichem Licht (jedoch ohne direkte Sonne) auf Tischen in Räumen mit entsprechender Temperatur standen. Bei einigen Versuchen wurden die Testblätter auch an der Pflanze eingerieben und nicht abgetrennt. Belichtung, Temperatur und Zahl der Testblätter wurden den jeweiligen Erfordernissen nach Möglichkeit angepaßt. Da die Wasserkontrolle als Bezugsgröße (= 100 Prozent) zu dienen hatte, wurde für sie in der Regel die doppelte Anzahl Testblätter gebraucht.

ERGEBNISSE

1. Versuche mit Säften aus *Datura stramonium* und *Solanum stoloniferum*

Über die infektionshemmende Wirkung des Saftes aus *Datura stramonium* habe ich früher (KÖHLER 1957) schon einmal berichtet. Inzwischen wurden weitere Versuchsreihen angesetzt, deren Ergebnisse nachstehend mitgeteilt werden. Die *Datura*-Säfte wurden unverdünnt zur Herstellung der Verdünnungsstufen verwendet.

Auf Abbildung 1 sind die Ergebnisse mit dem Tabakmosaikvirus (Abb. 1, TM) und mit dem Kartoffel-A-Virus (Abb. 1, A) an *Solanum demissum* im Wahrscheinlichkeitsnetz dargestellt. Die Zählergebnisse zum TMV-Versuch findet man auf Tabelle 1 verzeichnet. Bei beiden Versuchen ergeben sich im Wahrscheinlichkeitsnetz gerade Linien[2]). Die Empfindlichkeitsgrenzen liegen relativ

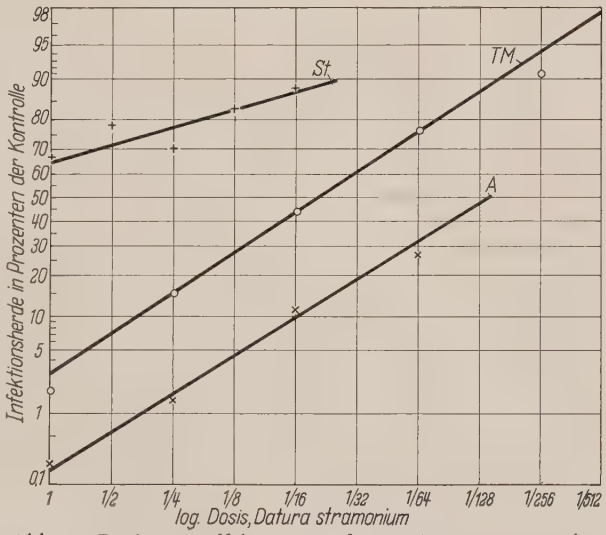


Abb. 1. Dosierungseffekt von Saft aus *Datura stramonium* bei Verimpfung im Gemisch mit dem A-Virus (A) und mit dem Tabakmosaikvirus (TM) auf *Solanum demissum*. Ferner Dosierungseffekt eines Saftes aus *Solanum stoloniferum*: Tabakmosaikvirus auf *Solanum demissum* (St). Wahrscheinlichkeitsnetz

[1]) Um die Versuche technisch bewältigen zu können, mußten bei vielen von ihnen einzelne Zwischenstufen ausgelassen werden.

[2]) Die Linien sind hier und im folgenden nach dem Augenmaß gezogen.

Tabelle 1

Anzahl Infektionsherde auf Blattfiedern von *Solanum demissum* nach Impfung mit dem Tabakmosaikvirus

Dosierung mit Saft von *Datura stramonium*					
Wasser	$^1/_{256}$	$^1/_{64}$	$^1/_{16}$	$^1/_4$	1
45					
44	26	32	17	8	2
44					
32	26	27	13	7	1
31					
30	23	22	12	6	1
28					
28	23	20	11	6	1
24					
22	22	20	10	5	0
22					
20	20	18	10	4	0
20					
20	19	13	9	3	0
18					
16	17	12	9	2	0
15					
13	17	11	7	2	0
12					
10	16	11	7	1	0
8					
8	16	8	6	1	0
8					
7	12	6	5	1	0
525 : 2 = 263	237	200	116	46	5
100 %	90 %	76 %	44 %	15 %	1,9 %

niedrig; sie sind bei dem Versuch mit A bei etwa 1 : 70 000 und mit TMV bei etwa 1 : 500 anzunehmen.

Abweichend fielen Versuche mit dem Kartoffel-X-Virus an *Gomphrena globosa* aus. Statt einer Geraden ergaben sich im Wahrscheinlichkeitsnetz Kurven von verschiedener Form (Abb. 2, X 1 und X 2). Abbildung 3 zeigt dieselben Versuche in einem Netz, dessen beide Achsen arithmetisch geteilt sind; hier liegen die Prozentwerte auf Geraden. Demnach folgt die Infektionshemmung auf *Gomphrena* einer anderen Gesetzmäßigkeit als auf *Solanum demissum*.

Ganz konforme Ergebnisse brachten Versuche mit Saft aus *Solanum stoloniferum*. In einem Versuch mit dem Tabakmosaikvirus auf *S. demissum* ergab sich wieder eine Gerade im Wahrscheinlichkeitsnetz (Abb. 1, St), und in einem Versuch mit dem X-Virus auf *Gomphrena* wieder eine Kurve im Wahr-

scheinlichkeitsnetz (Abb. 2, St 2) und eine Gerade im arithmetischen Netz (Abb. 3, St 2).

2. Versuche mit dem Saft aus *Dianthus caryophyllus*

Über den in Säften von *Dianthus caryophyllus* (Nelke) vorkommenden, offenbar sehr wirksamen Hemmstoff liegt eine sehr ausführliche Studie von RAGETLI (1957) vor. RAGETLI hat nachgewiesen, daß dieser Stoff durch die Beeinflussung des Wirtes hemmend wirkt und daß daneben eine Wechselwirkung zwischen Hemmstoff und Virus in vitro unwahrscheinlich ist. Die virushemmende Aktivität wird von ihm als eine Blockierung von Stellen („posities") im Bereich der Blattoberfläche gedeutet, die beim Zustandekommen von Infektionen eine entscheidende Rolle spielen.

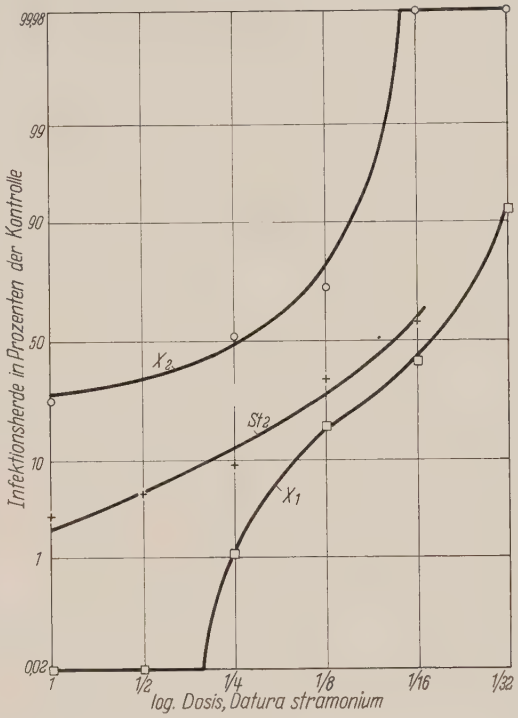


Abb. 2. X-Virus auf *Gomphrena globosa*. In zwei Versuchen (X_1 und X_2). Dosierung mit Saft aus *Datura stramonium*; in einem Versuch (St 2) Dosierung mit Saft aus *Solanum stoloniferum*. Wahrscheinlichkeitsnetz

a) Kartoffel-X-Virus getestet auf Samsuntabak[1])

X-Rohsaft auf $^1/_{10}$ verdünnt. Nelkensaft mit Wasser 1 : 1 verdünnt und davon Verdünnungsstufen hergestellt. Jede Stufe zu gleichen Teilen mit dem verdünnten X-Saft gemischt. Die Gemische wurden auf die beiden größten Blätter von je 10 jungen Samsunpflanzen (Wasserkontrolle 20 Pflanzen) im Gewächshaus ohne Karborundpuder aufgerieben. Nur die an den oberen Blättern erschienenen Läsionen konnten ausgewertet werden, da die Infektionen an den unteren, anfälligeren Blättern bei den höheren Verdünnungsstufen und bei

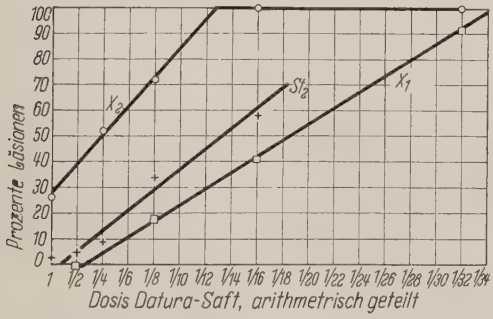


Abb. 3. Dieselben Versuche wie in Abbildung 2, jedoch beide Koordinaten arithmetisch geteilt

[1]) Zur Testung des X-Virus auf dem Samsuntabak können nur Stämme verwendet werden, die an dieser Pflanze regelmäßig deutliche Läsionen hervorrufen.

der Kontrolle zum Auszählen zu dicht waren (Tab. 2). Auf Abbildung 4, Linie A, sind die Prozentwerte (Wasserkontrolle = 100) in ein Wahrscheinlichkeitsnetz gegen die Verdünnungsstufen eingetragen. Die Regressionslinie ist eine Gerade. Die Empfindlichkeitsgrenze ist bei etwa 10^{-7} zu vermuten.

Tabelle 2

Anzahl Infektionsherde auf Blättern des Samsuntabaks nach Impfung mit Kartoffel-X-Virus

Wasser		Nelkensaft-Dosierung													
		1/50 000		1/10 000		1/5000		1/1000		1/500		1/100		1/50	
o[1])	u[1])	o	u	o	u	o	u	o	u	o	u	o	u	o	u
175		139		58	90	69	70	7	17	9	12	1	2	0	1
108															
103		97		46	67	49	54	7	13	6	9	0	0	0	1
93															
88		81		46	54	27	45	7	11	4	8	0	0	0	0
87															
86		67		43	45	26	43	6	10	3	8	0	0	0	0
85															
84		61		21	43	22	40	6	6	1	5	0	0	0	0
82															
74		44		17	34	20	22	4	5	1	5	0	0	0	0
66															
64		43		15	33	16	22	3	5	1	5	0	0	0	0
62															
53		42		15	30	16	22	2	3	1	3	0	0	0	0
51															
48		40		13	27	13	18	1	2	1	2	0	0	0	0
45															
43		13		12	23	4	15	0	1	0	1	0	0	0	0
23															
1520:2		627		285	(446)	262	(351)	43	(73)	27	(58)	1	(2)	0	(2)
= 760															
= 100		83%		38%		34%		5,7%		3,6%		0,13%		0%	

[1]) o = oberes Blatt, u = unteres Blatt.

nicht sicher zählbar — nicht sicher zählbar

b) Kartoffel-Aucubavirus, getestet auf *Solanum demissum*

Auf Abbildung 4 (Linie B) ist das Ergebnis von zwei zu verschiedenen Zeiten ausgeführten Versuchen mit dem Kartoffel-Aucubavirus mitgeteilt, von denen der eine (Quadrate) ohne, der andere (Kreise) mit Karborundbehandlung ausgeführt wurde. Bei großen Differenzen in den absoluten Werten ist die hohe Übereinstimmung in den Prozentwerten bei beiden Versuchen bemerkenswert.

Die Gerade (B), verläuft hier etwas steiler als die Gerade A des vorhergehenden Versuchs, die Verlängerungen beider Geraden stoßen etwa an derselben Stelle (bei 10^{-7}) auf die 100-Prozentlinie.

c) Kartoffel-A-Virus (Stamm 556), getestet auf *Solanum demissum*

Auf Abbildung 5 (Linie A) ist das Ergebnis eines ohne Karborundanwendung ausgeführten Versuches im Wahrscheinlichkeitsnetz dargestellt. Es erscheint wieder eine Gerade; ihre Verlängerung erreicht die 100-Prozentlinie bei annähernd 10^{-6}.

d) Tabakmosaikvirus, getestet auf *Solanum demissum*

Abbildung 6 zeigt das Ergebnis eines Versuchs, und zwar abweichend von der bisherigen Darstellung, nicht im Wahrscheinlichkeitsnetz, sondern bei arithmetisch geteilter Ordinate. Die Werte (Tab. 3) sind wie-

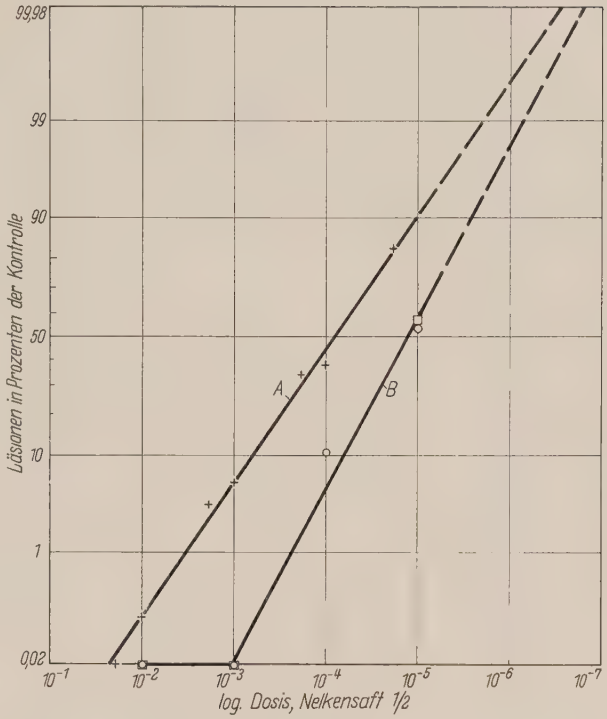


Abb. 4. Dosierungseffekt eines Saftes aus *Dianthus caryophyllus* bei Verimpfung des X-Virus auf Samsuntabak (A) und des Kartoffel-Aucubavirus (B) auf *Solanum demissum*. Wahrscheinlichkeitsnetz

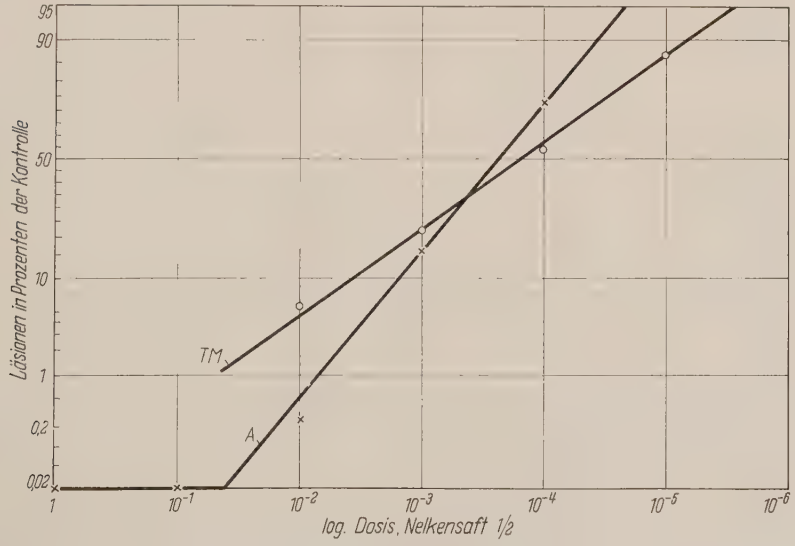


Abb. 5. Saft aus *Dianthus caryophyllus*: A-Virus und TM-Virus auf *Solanum demissum*. Wahrscheinlichkeitsnetz

Tabelle 3

Anzahl Infektionsherde auf Blattfiedern von *Solanum demissum* nach TMV-Verimpfung

Wasser	Nelkensaft-Dosierung 10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}
69 49	67	59	38	19	9
41 37	58	40	29	17	4
36 32	55	40	27	15	3
30 30	41	39	26	13	3
29 25	40	35	26	11	3
24 24	35	34	24	9	3
23 23	34	27	20	8	2
23 22	32	26	20	8	2
22 21	29	26	19	6	1
21 21	27	26	15	5	1
21 21	15	23	15	4	1
20 20	15	21	12	3	1
19 18	15	21	9	2	0
18 17	14	18	8	2	0
15 15	13	18	7	2	0
12 12	11	17	7	2	0
12 11	10	17	7	2	0
11 11	10	14	6	1	0
10 7	4	10	6	0	0
7 5	2	9	0	0	0
884 : 2 = 442	527	520	321	129	33
Prozent : 100	119	118	73	29	7,5

der als Prozente der Wasserkontrolle eingetragen. Man erkennt, daß die 100-Prozentlinie bei 10^{-5} um 18 und bei 10^{-6} um 19 Prozent überschritten wird. Wir haben hier eindeutig eine Augmenterwirkung vor uns. Vermutlich befindet

sich das Maximum zwischen den beiden Konzentrationen etwa bei 135 % und verläuft die Kurve ungefähr so, wie die gestrichelte Linie andeutet. Etwa bei 1 : 50 000 geht die Hemmung in eine Förderung über. Setzt man den mutmaßlichen Höchstwert = 100, so liegen die danach errechneten Werte im Wahrscheinlichkeitsnetz auf einer Geraden (Abb. 5, TM). Ihre Verlängerung schneidet die 100-Prozentlinie etwa bei 10^{-7}.

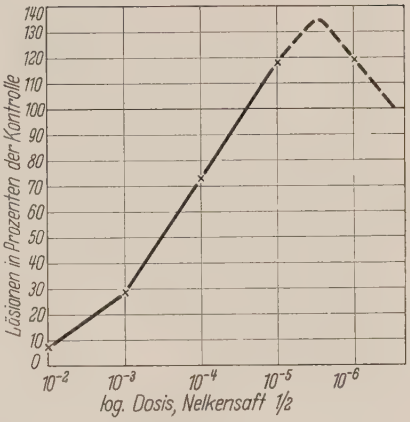


Abb. 6. Saft von *Dianthus caryophyllus*: Tabakmosaikvirus auf *Solanum demissum*. Ordinate arithmetisch, Abszisse logarithmisch. Augmenterwirkung

In einem anderen Versuch wurde der Nelkensaft nicht, wie sonst immer, zu gleichen Teilen, sondern im Verhältnis 1 : 10 mit Wasser verdünnt. Die einzelnen Verdünnungsstufen (s. die Angaben an der Abszisse, Abb. 7) wurden mit dem Virussaft zu gleichen Teilen gemischt. Im Wahrscheinlichkeitsnetz folgen die Prozentzahlen wieder befriedigend einer Geraden, wenn man von der Zufallsabweichung bei der Stufe 1/2 absieht (Abb. 7).

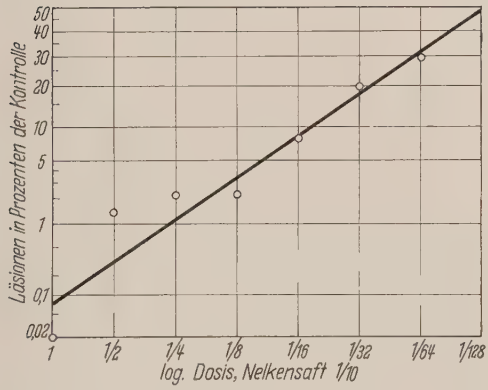


Abb. 7. Saft aus *Dianthus caryophyllus*: Tabakmosaikvirus auf *Solanum demissum*. Dosierung nur bis 1 : 128. Wahrscheinlichkeitsnetz

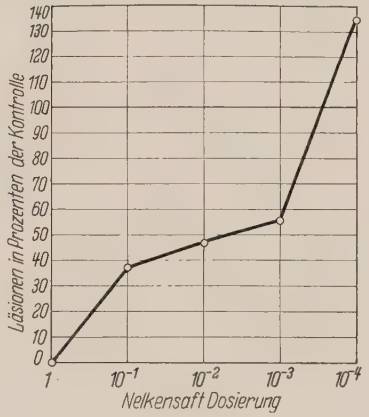


Abb. 8. Saft aus *Dianthus caryophyllus*: X-Virus auf *Gomphrena globosa*. Ordinate linear, Abszisse logarithmisch. (Erklärung im Text)

e) Kartoffel-X-Virus, getestet auf *Gomphrena globosa*

Der einzige diesbezügliche Versuch ist wegen der zu geringen Zahl der zustande gekommenen Infektionsherde nicht durchweg auswertbar. Da er aber eine eindeutige Augmenterwirkung erkennen läßt, ist die gefundene Wirkungskurve abgebildet (Abb. 8. Ordinate arithmetisch). Nimmt man — ziemlich willkürlich — das Maximum bei 140 Prozent an und setzt diesen Wert = 100, so liegen die danach errechneten Prozentwerte im Wahrscheinlichkeitsnetz nicht auf einer Geraden, sondern auf einer S-Kurve.

3. Versuche mit zwei Acridinfarbstoffen

Auf der Suche nach Farbstoffen mit einer ähnlichen Hemmwirkung wie bei den vorstehend untersuchten Pflanzensäften stieß ich auf das Acridinorange und das Trypaflavin.

Zunächst sei das Ergebnis mit diesen beiden Substanzen verwandter Struktur im Verimpfungsversuch mit dem Tabakmosaikvirus auf *Solanum demissum* mitgeteilt: Linie T (Abb. 9) gibt das Ergebnis eines Versuchs mit Trypaflavin, Linie A das Ergebnis eines Versuches mit Acridinorange im Wahrscheinlichkeitsnetz wieder. Auf der Abszisse sind die Verdünnungsprozente der Farbstofflösungen angegeben, die zu gleichen Teilen mit infektiösem Rohsaft gemischt wurden. Beide Regressionslinien gehen etwa vom gleichen Punkt der Abszisse aus, um dann beträchtlich zu divergieren: Linie T erreicht die 100-Prozentlinie bei etwa 1 : 30 000, Linie A dagegen schon bei etwa 1 : 5000. Diese Unterschiede könnten allein auf solchen des Virustiters beruhen.

Linie TA (Abb. 10) gibt das Ergebnis eines Versuchs mit Trypaflavin bei Verimpfung des Kartoffel-A-Virus auf *Solanum demissum* wieder.

In den Versuchen mit dem X - V i r u s verhielten sich die beiden Farbstoffe grundsätzlich verschieden. Die Infektiositätskurve mit Trypaflavin auf *G. globosa* hatte im halblogarithmischen Netz S-Form, wobei in den niedrigen Dosierungen eine deutliche Augmenterwirkung zutage trat (Abb. 11, X_3). Setzt man den Wert für $^1/_{128}$ = 100, so erhält man die folgenden Prozentwerte:

Verdünnung	$^1/_{64}$	$^1/_{32}$	$^1/_{16}$	$^1/_8$	$^1/_4$	$^1/_2$
Prozente	87	86	68	39	19	12

Im Wahrscheinlichkeitsnetz liegen diese Werte ziemlich befriedigend auf einer Geraden (Abb. 10, X_3).

Mit Acridinorange ergab sich sowohl an *G. globosa* wie am Samsuntabak etwa dieselbe stark abweichende komplizierte Kurve, die vermuten läßt, daß dieser Farbstoff außer seiner stark infektionswidrigen Wirkung auf die Wirte auch noch eine spezifische — vermutlich inaktivierende — Wirkung auf das X-Virus ausübt (Abb. 11, X_1 auf Samsuntabak, X_2 auf *G. globosa;* zum weiteren Vergleich ist noch die S-förmige Infektiositätskurve des TMV auf *S. demissum* eingezeichnet).

4. Versuche mit Kupfersulfat

Auch die durch Kupfersulfat verursachte Hemmungskurve entspricht im Wahrscheinlichkeitsgesetz einer Geraden, und zwar sowohl auf *G. globosa* (mit X) und auf *N. glutinosa* (mit TMV). In Tabelle 4 sind die Zählergebnisse eines Versuchs der erstgenannten Kombination mitgeteilt.

5. Versuche mit dem Saft aus Himbeerblättern

Die infektionshemmende Wirkung des Saftes aus Himbeerblättern ist bekannt. Sie beruht auf der irreversiblen Inaktivierung des Virus in vitro durch das im Saft enthaltene Tannin und nicht auf dessen Einwirkung auf die

Tabelle 4

Anzahl Infektionsherde je Blatt

Dosis $CuSO_4$ (proz. Lösung)

Wasser	1/32	1/16	1/8	1/4	1/2	1
34						
32	19	17	5	3	1	0
25						
22	18	13	4	3	0	0
22						
18	16	13	4	2	0	0
16						
16	15	11	3	2	0	0
16						
15	14	11	2	2	0	0
15						
15	14	10	2	2	0	0
14						
14	13	9	2	1	0	0
14						
13	12	7	2	1	0	0
13						
12	11	7	2	1	0	0
12						
12	11	6	2	1	0	0
11						
11	11	6	2	0	0	0
11						
11	9	5	1	0	0	0
11						
10	9	5	1	0	0	0
10						
10	8	5	1	0	0	0
9						
9	8	4	1	0	0	0
8						
7	7	4	1	0	0	0
7						
6	7	4	0	0	0	0
6						
6	5	3	0	0	0	0
6						
5	5	3	0	0	0	0
2						
1	4	2	0	0	0	0
517:2 =						
Summen: 259	226	145	35	18	1	0
Prozente: 100	83	56	14	7	0,4	0

Infektionshemmung durch Kupfersulfat bei Verimpfung des X-Virus auf *Gomphrena globosa*.

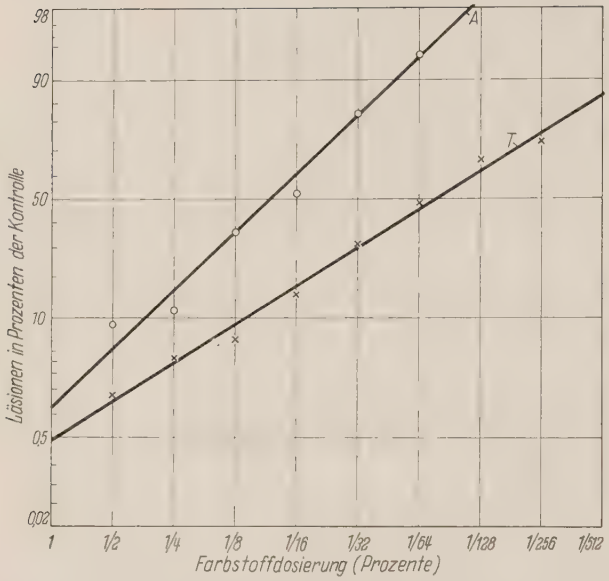


Abb. 9. Dosierungseffekt von Trypaflavin (T) und Acridinorange (A) auf die Verimpfung des Tabakmosaikvirus zu *S. demissum*. Wahrscheinlichkeitsnetz

Pflanze (CADMAN 1959). Es ist von Interesse, die Form der Dosis-Effektkurve kennenzulernen. Wodurch unterscheidet sie sich von den anderen vorstehend beschriebenen Hemmungskurven?

Auf Abbildung 12 ist unter T 1 (Kreuze) das Ergebnis aus zwei Versuchen (Mittelwerte) mit dem TMV auf *S. demissum* mitgeteilt. Der TMVhaltige Tabaksaft war vor der Vermischung mit den Verdünnungsstufen des Himbeerblattsaftes mit Wasser im Verhältnis 1 : 500 verdünnt worden. Die Linie T 2 stellt das Ergebnis von zwei Versuchen dar, in denen der TMV-Saft im Verhältnis 1 : 100 verdünnt worden war. Die Linie X ist das Ergebnis eines Versuchs mit dem Kartoffel-X-Virus auf *Gomphrena globosa*. In dem vorliegenden Koordinatensystem (Befallsprozente auf der Ordinate arithmetisch, Dosierung mit Himbeerblattsaft logarithmisch) ist die Dosiseffektkurve bei allen Versuchen eine Gerade. Beim X-Versuch kann keine Abweichung erwartet werden, weil das Tannin nicht auf die Wirtspflanze wirkt. Die reine „Inaktivierungskurve" ist demnach von den eigentlichen Hemmungskurven eindeutig unterscheidbar.

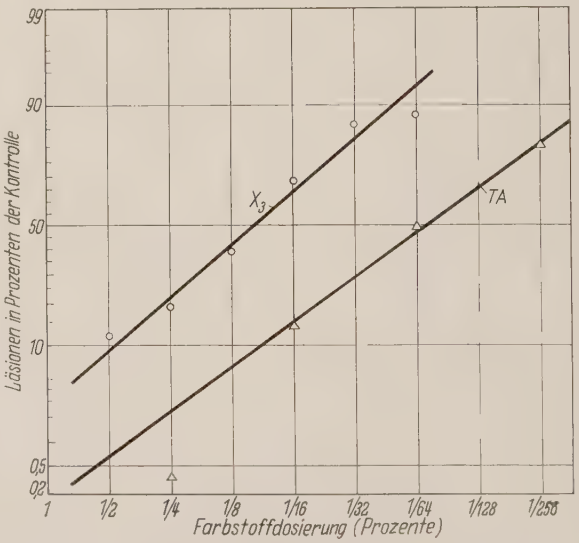


Abb. 10. Trypaflavin. Dosierungseffekt im Wahrscheinlichkeitsnetz. TA: Verimpfung des A-Virus auf *S. demissum*. X_3: X-Virus auf *Gomphrena globosa*, wenn der Wert von $^1/_{128}$ = 100 gesetzt wird (vgl. X_3 bei linear geteilter Ordinate auf Abb. 11)

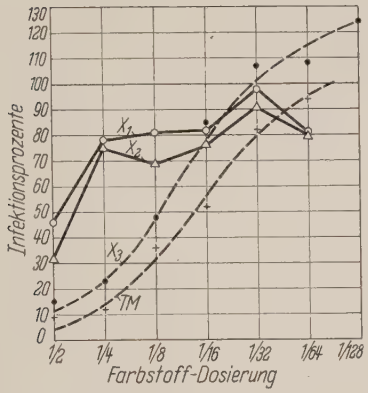


Abb. 11. Wirkungskurve des Acridinorange: X_1 auf dem Samsuntabak, X_2 auf *G. globosa* und TMV auf *S. demissum*. X_3:Wirkungskurve des Trypaflavins: X auf *Gomphrena*

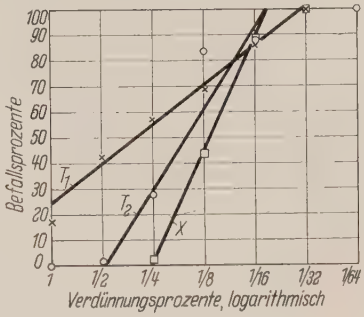


Abb. 12. Dosierungseffekt von Himbeer-Blattsaft bei Verimpfung des Tabakmosaikvirus auf *Solanum demissum* (zwei Versuche T 1 und T 2) und des X-Virus zu *Gomphrena globosa* (X). Ordinate arithmetisch, Abszisse logarithmisch geteilt

6. Versuche mit einigen anderen Stoffen

Die Wirkung der im folgenden noch genannten Stoffe wurde durchweg mit dem X-Virus an *Gomphrena globosa* untersucht.

Mit Malachitgrün (Abb. 13, zwei Versuche) erhält man eine Kurve von demselben Charakter wie mit Himbeerblattsaft. Dies würde also darauf schließen lassen, daß das X-Virus durch diesen Farbstoff ebenfalls in vitro inaktiviert wird.

Eosin, gelblich (Abb. 14), das bei starker Dosierung eindeutig toxisch wirkt, zeigt bei schwacher Dosierung eine sehr beträchtliche infektionsfördernde Wirkung. Setzt man den wahrscheinlichen Höchstwert 180 = 100, so ergibt sich im Wahrscheinlichkeitsnetz eine Gerade (Abb. 15).

Eigentümliche Verhältnisse wurden bei Thymol[1]) angetroffen (zwei Versuche, Abb. 16). Während bei der höchsten Dosierung (gesättigte Lösung zwischen 85 und 90 Prozent Infektionsherde gezählt wurden, fielen die

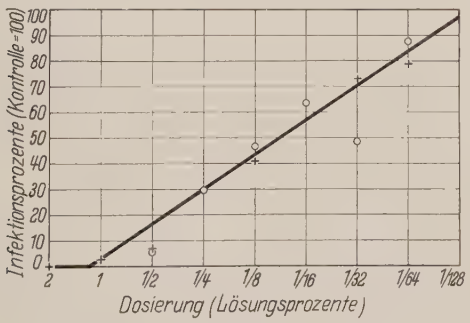


Abb. 13. Zwei Versuche mit Malachitgrün: X-Virus auf *Gomphrena globosa*. Netz wie bei Abbildung 12

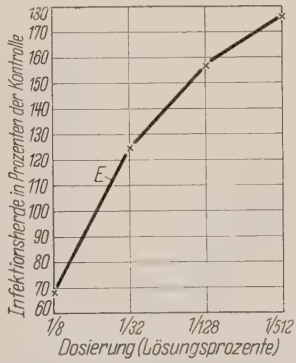


Abb. 14. Erklärung im Text

[1]) Präparat „Thymolum cryst. F. ca. 50 °“ von E. Merck.

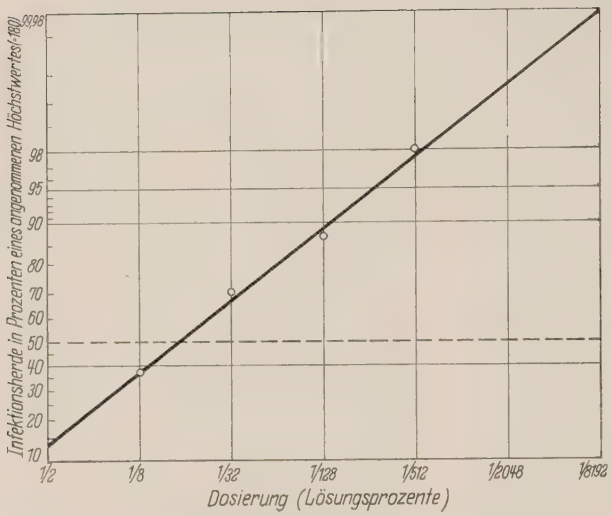


Abb. 15. Versuch mit Eosin: X-Virus auf *Gomphrena globosa* (Augmenterwirkung). Wahrscheinlichkeitsnetz

Werte bei den Verdünnungen bis etwa 1 : 100 allmählich auf ein Minimum von etwa 50 Prozent, um dann wieder anzusteigen. Wegen der hohen Schwankungen der Einzelwerte erscheint noch eine Betätigung erforderlich. Dieses Ergebnis scheint gänzlich aus dem Rahmen des bisher Bekannten zu fallen.

Keine Wirkung ließ sich mit Resorcin und dl-Tryptophan nachweisen.

7. Die Wirkung der Hemmsubstanzen auf flottierende Blattausschnitte

Die toxische Wirkung von Hemmsubstanzen läßt sich in grober Form bei höheren Dosierungen in einfacher Weise an kreisförmigen Blattausschnitten, die man auf den hemmstoffhaltigen Flüssigkeiten flottieren läßt, demonstrieren.

Blattfiedern von *Solanum demissum* wurden unter Verwendung von Karborundpuder wie üblich auf der Oberseite mit Kartoffel-A-Virus eingerieben. Eine Stunde später wurden ihnen mit dem Korkbohrer die Ausschnitte entnommen und auf Nelkensaft verschiedener Verdünnung in Petrischalen gesetzt. Nach 4 Tagen wurde folgender Befund notiert:

Auf Wasser sowie auf den Verdünnungen 1 : 80, 1 : 40 und 1 : 20 sind viele gut entwickelte Infektionsherde in etwa gleicher Zahl erschienen. Während sich aber die Herde auf 1 : 80 und 1 : 40 nicht von der Wasserkontrolle unterschieden, waren sie auf 1 : 20 kleiner und matter geblieben, auch hatten die Stücke ihre Turgeszenz verloren. Es ist also eine deutliche Schädigung eingetreten. Auf 1 : 10 waren die Herde noch kleiner als auf 1 : 20, außerdem waren es weniger. Auf 1 : 10 und 1 : 20 war zudem das Gewebe im Umkreis der Infektionsherde hellverfärbt und offensichtlich geschädigt; dies war auf 1 : 10 in verstärktem Maße der Fall. Zweifellos wirkt also der Nelkensaft in Verdünnungen 1 : 20 und darunter stark toxisch auf das Gewebe der Ausschnitte, wie an allen Wundstellen zu konstatieren ist, durch die der Saft eindringen kann. Auf 1 : 10 kommt

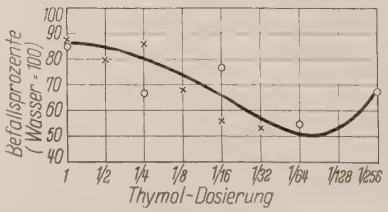


Abb. 16. Zwei Versuche mit Thymol: X-Virus auf *Gomphrena globosa*. Erklärung im Text

es sogar zu einer Art Infektionshemmung, die aber sicher nur darauf zurückzuführen ist, daß das Zentrum der jungen Infektionsherde schon sehr früh nekrotisch wird, so daß das Toxicum alsbald durch die Nekrosen eindringen, sich im Herd ausbreiten und dessen Entwicklung abbremsen kann.

Ein Versuch an (ungeimpften) *Gomphrena*-Blattausschnitten, gleichfalls mit Nelkensaft, hatte ein ganz analoges Ergebnis. Nach 8 Tagen wurde folgender Befund notiert:

1 : 160 und Wasserkontrolle .... Keine Veränderung,

1 : 80 .... Teilweise leichte Randverfärbung,

1 : 40 .... Durchweg breite Randverfärbung,

1 : 20 .... Schädigung zum Teil nach innen vorgedrungen; die Interzellularräume der geschädigten Teile sind mit Flüssigkeit erfüllt und durchscheinend; das geschädigte Gewebe hat seine Turgeszenz verloren,

1 : 10 .... Die Stücke sind in toto dunkelgrün-transparent; sie zeigen völligen Verlust der Turgeszenz.

Nach weiteren 8 Tagen waren auch die Stücke bei 1 : 20 total geschädigt, und bei den anderen Konzentrationen hatten sich die Schädigungen entsprechend verstärkt. Nur bei 1 : 160 und der Wasserkontrolle waren die Stücke augenscheinlich noch intakt.

Ein entsprechender Versuch an mit A-Virus geimpften Blattausschnitten von *Solanum demissum* auf Trypaflavinlösungen verschiedener Konzentration hatte folgendes Ergebnis (Befund nach 3 Tagen).

Wasserkontrolle: Ausschnitte normal, Infektionsherde in größerer Zahl sichtbar.

0,0125 %: Nur die zentralen Teile der Ausschnitte noch normal, sonst transparent. Die Infektionsherde mehr oder weniger unterdrückt.

0,05 und 0,025: Ausschnitte beinahe in ganzer Ausdehnung transparent, Ränder dunkel verfärbt. Keine Infektionen sichtbar.

BESPRECHUNG

Das vorliegende Material ist noch in vieler Hinsicht ergänzungsbedürftig. Immerhin heben sich einige Befunde mit der nötigen Klarheit heraus.

Die Hemmwirkung der Säfte von *Datura stramonium, Dianthus caryophyllus* und *Solanum stoloniferum* folgt augenscheinlich derselben Gesetzmäßigkeit: Bei Verimpfung mit verschiedenartigen Viren zu *Solanum demissum* und zum Tabak ergibt sich stets eine Wirkungskurve, die im Wahr-

scheinlichkeitsnetz eine Gerade ist (Typ A, Tab. 5). Bei Verimpfung zu *Gomphrena globosa* ist gleichfalls eine volle Übereinstimmung vorhanden, jedoch zeigt die Wirkungskurve hier einen abweichenden Verlauf. Sie erscheint nicht im Wahrscheinlichkeitsnetz, sondern im arithmetisch geteilten Netz als Gerade (Typ B, Tab. 5). Diese Versuche an *Gomphrena* wurden ausschließlich mit dem X-Virus angestellt.

Die Wirkungskurve des Trypaflavins folgt bei allen Verimpfungen, also unabhängig von Virus und Wirtspflanze, derselben Gesetzmäßigkeit: Im Wahrscheinlichkeitsnetz ist die Wirkungskurve in allen Fällen eine Gerade, auch bei *Gomphrena* als Wirt (Typ A).

Bei Acridinorange wird mit dem X-Virus sowohl auf *G. globosa* als auch auf dem Samsuntabak ein stark abweichendes Verhalten festgestellt, während mit dem TMV ein Verhalten nach Typ A vorliegt. Das abweichende Verhalten läßt auf eine spezifische Beeinflussung des X-Virus durch diesen Farbstoff schließen.

Dosis-Effektkurven, die im Wahrscheinlichkeitsnetz — oder was gleichbedeutend ist, im Probitnetz — als gerade Linie erscheinen, sind als Attribut toxischer Wirkung aus der Literatur wohlbekannt. Die phytotoxische Wirkung der verschiedensten Herbizide zeigt z. B. diese Gesetzmäßigkeit, wie sich besonders bei Spritz- und Keimungsversuchen an den verschiedensten Objekten ergab (u. a. BLACKMAN 1955, SAMPFORD 1955, SIMON, ROBERTS u. BLACKMAN 1955). Aber auch das Wachstum der Wasserlinse *Lemna minor* und des Schimmelpilzes *Trichothecium viride* unter dem Einfluß verschiedener Gifte unterliegt derselben Gesetzmäßigkeit (BLACKMAN).

Es ist nun die Frage, ob die infektionswidrige Wirkung nach Typ A in jedem Fall als eine cytotoxische zu deuten ist. Für die beiden Acridinfarbstoffe und das Kupfersulfat dürfte diese Annahme zutreffen. Die cytotoxische Wirkung des Kupfersulfats ist bekannt, und auch für die Acridinfarbstoffe ist sie vielfach nachgewiesen (u. a. BOGEN und KESER 1954). Eine stark toxische Wirkung des Trypaflavins auf den Samsuntabak hatte ich selbst früher festgestellt (KÖHLER 1941). Bei den Pflanzensäften hingegen dürfte die infektionswidrige Wirkung auf einer andersartigen Beeinflussung des Wirtsplasmas beruhen, etwa im Sinne RAGETLIS,wobei sich die spezifische Ansprechbarkeit des jeweiligen Wirts besonders geltend macht.

Die Hemmung kann nicht darauf beruhen, daß das Virus etwa daran gehindert wäre, sich seines Proteinanteils zu entledigen, denn nach RAGETLI ist die verimpfte Virusnucleinsäure der Hemmung ebenso unterworfen wie das intakte Virus, wobei freilich der Verlauf der Wirkungskurve noch festzustellen wäre.

Eine Augmenterwirkung wurde in mehreren Versuchen festgestellt:

1. Nelkensaft: Verimpfung des TM-Virus zu *S. demissum* (Abb. 6, TM),

2. Nelkensaft: Verimpfung des X-Virus zu *G. globosa* (Abb. 8),
3. Trypaflavin: Verimpfung des X-Virus zu *G. globosa* (Abb. 11, X_3),
4. Eosin: Verimpfung des X-Virus zu *G. globosa* (Abb. 14).

Wenn man die mutmaßlichen Höchstwerte bei diesen Versuchen (außer dem zweitgenannten) = 100 setzt, so kommen die umgerechneten Einzelwerte im Wahrscheinlichkeitsnetz regelmäßig auf eine Gerade zu liegen. Der zweitgenannte Versuch macht eine Ausnahme, seine Wirkungskurve hat im Wahrscheinlichkeitsnetz S-Form. Hier müssen besondere Gesetzmäßigkeiten vorliegen.

Der Umstand, daß — von der genannten Ausnahme abgesehen — die Wirkungskurve eine Gerade ist, zeigt, daß die Hemmung unvermittelt in eine Förderung übergeht; die Wirkung kehrt sich um. Dies läßt darauf schließen, daß für die Infektionssteigerung durch den Nelkensaft derselbe Stoff verantwortlich zu machen ist, der bei stärkerer Dosierung infektionswidrig wirkt.

Übrigens erscheint die Annahme (Köhler 1958), daß die unter der Kutikula endigenden, mit Plasma erfüllten „Ektodesmen" als Eingangspfor-

Tabelle 5

Übersicht über die verschiedenen Kombinationen und die aufgetretenen Infektionstypen (A, B und C)
(abw. = abweichendes Verhalten)

Hemmstoff	Virusart				Wirt		
	A	X	TM	K. Aucuba	*S. demissum*	*G. globosa*	*N. tabacum* (Samsun)
Datura stramonium-Saft	A	B	A		A A	B	
Dianthus caryophyllus-Saft	A	A B	A	A	A A A	B	A
Solanum stoloniferum-Saft		B	A		A	B	
Trypaflavin	A	A	A		A A	A	
Acridinorange		abw. abw.	A		A	abw.	abw.
Himbeerblattsaft		C	C		C	C	
Malachitgrün		C				C	
Eosin		A				A	
Kupfersulfat		A				A	

ten des Virus in die Epidermiszelle dienen würden, nach den elektronenmikroskopischen Befunden von SCHNEPF (1959) angesichts der Enge dieser Durchlässe nicht mehr diskutabel, und man wird die hemmende und fördernde Wirkung ins Innere der mechanisch geöffneten und dabei mit Virus beschickten Epidermiszelle selbst verlegen müssen.

Daß die infektionshemmende Wirkung des Himbeerblattsaftes (Abschnitt 5) wegen seines Gerbstoffgehalts auf der Inaktivierung des Virus in vitro beruht, ist bekannt. An Dosierungsreihen ließ sich die Aktivitätsabnahme hier als gerade Linie in einem Koordinatensystem demonstrieren, auf dessen Ordinate die Befallsprozente in arithmetischer Abmessung gegen die log. Dosis auf der Abszisse eingetragen sind. Die reine „Inaktivierungskurve" ist also offensichtlich von den eigentlichen Hemmungskurven gut unterscheidbar. Die Wirkung des Malachitgrüns bei Verimpfung des X-Virus zu *Gomphrena* erwies sich als der des Himbeerblattsaftes analog.

Es wird sich zeigen müssen, in welchen Grenzen Infektionsversuche nach dem Dosierungsverfahren etwa zur Bestimmung der cytotoxischen Wirkung von Pflanzenschutzmitteln und anderen Stoffen anwendungsfähig sind.

Zusammenfassung

Die infektionshemmende Wirkung von Säften aus *Datura stramonium, Solanum stoloniferum* und *Dianthus caryophyllus* sowie wässeriger Lösungen der Acridinfarbstoffe Trypaflavin und Acridinorange und einiger anderer Stoffe wurde an Verdünnungsreihen quantitativ untersucht. Dazu wurden die einzelnen Verdünnungsstufen zu gleichen Teilen mit infektiösen Blattsäften gemischt und die Gemische durch Einreiben auf die Blätter geeigneter Testwirte verimpft. Die aufgetretenen Infektionsherde („Läsionen") wurden gezählt. Als Testwirte dienten die Arten *Solanum demissum, Gomphrena globosa* und, in geringerem Ausmaße, *Nicotiana tabacum* var. Samsun.

Einen Überblick über die geprüften Kombinationen mit den dabei nachgewiesenen Infektionstypen bietet Tabelle 5 (Seite 257). Es wurden vornehmlich zwei Reaktionstypen, A und B, festgestellt. Die Regressionslinie von Typ A ist durch eine gerade Linie im Wahrscheinlichkeitsnetz (Befallsprozente nach dem GAUSSschen Integral gegen die log. Dosis aufgetragen) gekennzeichnet. Die Regressionslinie von Typ B hingegen stellt sich im linear geteilten Netz als Gerade dar.

Die Blätter von *S. demissum* und — soweit untersucht — von *N. tabacum* reagierten auf die genannten Pflanzensäfte so wie auf die beiden Farbstoffe nach Typ A. Die Blätter von *Gomphrena globosa* reagierten auf die Pflanzensäfte nach Typ B, auf die Farbstoffe verschieden. Die Art des Virus war dabei ohne Einfluß auf den Reaktionstyp.

Wieweit die Wirkung nach Typ A als einfache toxische Wirkung gedeutet werden kann, wie sie in vielen anderen Versuchen mit Giftstoffen, insbe-

sondere Spritz- und Keimungsversuchen, ihre Parallele findet, ist ungewiß. Die Wirkungskurve nach Typ B wird als Modifikation von Typ A aufgefaßt; sie wird mit dem Eingreifen eines spezifischen Empfindlichkeitsfaktors im *Gomphrena*-Plasma zu erklären versucht. Die toxische Wirkung der Hemmsubstanzen wurde an flottierenden Blattausschnitten direkt nachgewiesen; jedoch bleibt fraglich, wieweit auch bei niedriger Dosierung noch mit ihr zu rechnen ist.

In mehreren Versuchen wurde eine Infektionsförderung (Augmenterwirkung) festgestellt. Der geradlinige Verlauf der Wirkungskurve im Wahrscheinlichkeitsnetz läßt erkennen, daß die Hemmungskurve nach Erreichung des Hemmungs-Nullpunktes mit derselben Stetigkeit als Förderungskurve bis zur Erreichung eines Maximums fortgesetzt wird.

Schließlich wurde die Wirkung von Himbeerblattsaft, von dem bekannt ist, daß er infolge seines Tanningehalts das Virus in vitro irreversibel inaktiviert, in der gleichen Weise wie die Hemmstoffe untersucht. Abweichend von den Typen A und B ergab sich dabei eine Gerade in einem Koordinatensystem mit arithmetischer Abmessung auf der Ordinate gegen eine logarithmische Abmessung auf der Abszisse (Typ C). Denselben Modus ließ die Verimpfung mit Malachitgrün erkennen.

Einen völlig abweichenden Verlauf zeigte die Wirkungskurve des Thymol. Ohne Wirkung waren Resorcin und dl-Tryptophan.

Summary

Quantitative investigations were made on the inhibition of infection by sap from *Datura stramonium, Solanum stoloniferum* and *Dianthus caryophyllus* and of aqueous solutions of the acridine pigments trypoflavin and acridine orange, and of some other compounds all in series of varied dilutions. The respective degrees of dilution were mixed with the same quantities of infectious leaf sap and the mixture was inoculated into the leaves of suitable test hosts by rubbing. The number of infection sites (lesions) was counted. The species serving as test hosts were *Solanum demissum, Gomphrena globosa* and, to a lesser extent, *Nicotiana tabacum* var. Samsun.

A summary of the combinations tested, with the infection types found, is given in Table 5 (p. 257). Two reaction types, A and B, were found chiefly The regression curve of type A forms a straight line when plotted on probability paper (infection percentage on the Gauss integral plotted against the log. dose). The regression curve of type B on the other hand forms a straight line when plotted linearly.

The leaves of *S. demissum* and, as far as they were investigated, *N. tabacum* reacted according to type A against the plant saps and the two pigments. The leaves of *Gomphrena globosa* reacted to the plant saps

according to type B and to the pigments differently. The species of virus was without influence on the reaction type in these tests.

To what extent the type A reaction may be interpreted as a simple toxic effect, having its parallel in many other experiments with poisons, particularly with sprays and germination tests is uncertain. The type B reaction curve is regarded as a modification of type A; it is explained on the basis of the intervention of a specific susceptibility factor in the *Gomphrena* cytoplasm. The toxic action of inhibitory substances was demonstrated directly on floating portions of cut leaves. But is remains questionable, how far this toxic action is still effective at lower doses.

In several experiments a stimulation of infection was demonstrated (augmentation effect). The straight line of the reaction curve on probability paper shows that the inhibition curve is, after reaching the zero point for inhibition, continued with the same gradient as a stimulation curve, until a maximum is reached.

Finally the sap of raspberry leaves, which is known to inactivate the virus irreversible in vitro on account of its tannin content, was tested in the same way as the inhibitory substances. In contrast to types A and B, in this case there was a straight line in a coordinate system, with the ordinates plotted arithmetically against the abscissae measured logarithmically (type C). A similar reaction was given by inoculation with malachite green.

The reaction curve for thymol was quite exceptional. Resorcinol and dl-tryptophane were without effect.

Literaturverzeichnis

BARTELS, W., 1955: Der gegenwärtige Stand der Forschung auf dem Gebiet der Inaktivierung pflanzenpathogener Viren, insbesondere des Tabakmosaikvirus. Phytopath. Z. **24**, 117—178.

BAWDEN, F. C., 1954: Inhibitors and Plant Viruses. Advanc. Virus Res. **2**, 32—57.

BENDA, G. T. A., 1956: The effect of New Zealand spinach juice on the infection of cowpeas by tobacco ringspot virus. Virology **2**, 438—454.

BLACKMAN, G. E., 1952: Studies on the principles of phytotoxicity. I. The assessment of relative toxicity. J. exp. Bot. **3**, 1—27.

BLASZCZAK, W., A. F. ROSS and R. H. LARSON, 1959: The inhibitory activity of plant juices on the infectivity of potato virus X. Phytopathology **49**, 784—791.

BOGEN, H. J., und M. KESER, 1954: Eiweiß-Abbau durch Acridinorange bei Hefezellen. Physiol. Plantarum **7**, 446—462.

CADMAN, C. H., 1959: Some properties of an inhibitor of virus infection from leaves of raspberry. J. gen. Microbiol. **20**, 113—128.

DALE, J. L., and H. H. THORNBERRY, 1955: Effect of some compounds and biological products upon infection by tobacco mosaic virus. Illinois Acad. Sci. Transact. **47**, 65—71.

KÖHLER, E., 1941: Desinfektionsversuche an Rohsäften des Tabakmosaik- und des Kartoffel-X-Virus. Zbl. Bakt. (II) **103**, 325—334.

Köhler, E., 1957: Über die Beziehungen zwischen Viruskonzentration von Impflösungen und Infektionshäufigkeit. III. Phytopath. Z. **29**, 197—203.

— —, 1958: Das Verhalten des X-Virus in damit geimpften Blättern unterschiedlichen Resistenztyps. Proc. 3rd Conf. Potato Virus Diseases, Lisse-Wageningen 1957. 189—198.

Ragetli, H. W. J., 1957: Onderzoekingen over een virushemstof voorkomend in *Dianthus caryophyllus* L. T. Plantenziekt. **63**, 245—344.

Sampford, M. R., 1952: Studies on the principles of phytotoxicity. II. J. exp. Bot. **3**, 28—46.

Schnepf, E., 1959: Untersuchungen über Darstellung und Bau der Ektodesmen und ihre Beeinflußbarkeit durch stoffliche Faktoren. Planta **52**, 664—708.

Simon, E. W., H. A. Roberts and G. E. Blackman, 1952: Studies on the principles of phytotoxicity. III. J. exp. Bot. **3**, 99—109.

Società Montecatini-Istituto di Ricerche Agrarie
Laboratorio di Signa (Firenze), Italia
Direttore: Dr. Giovanni Pellegrini

Indagini sul *Gloeosporium olivarum* Alm., agente dalla „lebbra" delle olive

di

N. Loprieno e I. Tenerini

Con 19 figure

Indice: Premessa. Parte sperimentale. — 1. Isolamento del patogeno. — 2. Ricerca del più idoneo substrato artificiale per l'allevamento del *Gloeosporium olivarum* e per la produzione di conidi. — 3. Influenza della temperatura e dell'età della coltura sulla produzione di conidi su substrato artificiale. — 4. Influenza della temperatura sulla germinazione dei conidi. a) Allestimento delle colture ed età dei conidi; b) Tecnica dei saggi; c) Percentuale di germinazione a diverse temperature; d) Velocità di germinazione. — 5. Influenza della luce sulla germinazione dei conidi. — 6. Influenza del pH dell'acqua sulla germinazione dei conidi. — 7. Influenza della temperatura sulla vitalità dei conidi, esposti in ambiente secco per vari periodi di tempo. — 8. Influenza della temperatura sulla infezione delle olive, sullo sviluppo della „lebbra" e sulla sporulazione del patogeno „in vivo". — 9. Influenza della persistenza dell'acqua sulle drupe sulla percentuale di attecchimento della „lebbra". — 10. Influenza del grado di maturazione delle olive sull'attecchimento e lo sviluppo „in vivo" del *G. olivarum*. — 11. Influenza della presenza di ferite sull'attecchimento dell'infezione del *G. olivarum*. — Discussione ed interpretazione dei risultati. — Riassunto. — Summary. — Zusammenfassung. — Citazioni bibliografiche.

PREMESSA

Da circa dieci anni (19) risulta presente in alcune regioni dell'Italia (Puglie, Calabria e Sicilia) una micosi delle drupe di olivo, la „lebbra" o „gloeosporiosi", causata da *Gloeosporium olivarum* Alm. Questa malattia, descritta per la prima volta in Portogallo nel 1899 (19) da V. de Almeida — il quale classificò per primo l'agente patogeno — è andata sempre più estendendosi in altre zone olivicole, sino ad occupare al momento attuale una vasta area di diffusione: Portogallo, Grecia, Giappone, Spagna, Stati Uniti, Argentina, Italia (10), Sud Africa (8), URSS e Uruguay (21), causando gravissimi danni alla produzione olivicola.

Gli attacchi del parassita si manifestano generalmente sulle drupe invaiate sulle quali si producono delle depressioni circolari: in queste l'epicarpo si increspa. In corrispondenza di tali aree, nel mesocarpo, si

formano gli acervuli, visibili all'esterno in forma di pustoline nerastre: in condizioni di elevata umidità, per effetto della pressione esercitata dai conidi, si rompe l'epicarpo e fuoriesce all'esterno una massa gelatinosa di colore giallo-arancione; successivamente il mesocarpo secca e diventa coriaceo.

Le alterazioni suddette si estendono col tempo sino ad interessare tutta la drupa. Le olive colpite (fig. 1) si raggrinzano e mummificano o cascolano.

Fig. 1. Sintomi di „lebbra" su olive cv. Leccino, infettate artificialmente in ambiente condizionato

In alcune regioni, come ad esempio in Calabria, le drupe mummificate persistono sulla pianta anche sino alla primavera successiva: poichè in tale regione si procede alla raccolta sul terreno delle olive via via che queste, per raggiunta maturazione, cadono al suolo, l'attacco del parassita riduce ancor più il raccolto.

Le infezioni del *G. olivarum* si possono manifestare in forma grave anche sulle olive cascolate apparentemente sane, ma precedentemente infettate sulla pianta, in quanto le condizioni di umidità esistenti sul terreno favoriscono lo sviluppo della „lebbra" (20).

In conseguenza dell'attacco, si può verificare la perdita totale del prodotto, come nel caso delle olive da tavola, oppure si riduce la resa in olio e si altera la qualità di esso (elevata acidità; colore rossiccio [10]). Secondo un'indagine svolta in Calabria da G. Martelli (16), nel 1958 a Castrovillari (prov. di Cosenza) partite di olive colpite da „lebbra" per il 70—75 % hanno prodotto olio con acidità dell'11,5 %. Secondo tale Autore la percentuale di acidità dell'olio è in funzione dell'incidenza dell'attacco di *G. olivarum*, cui soggiacciono le olive.

L'insediamento del patogeno sulle drupe è favorito generalmente da elevata umidità e da una temperatura oscillante intorno ai 20 °C.: comunque le condizioni climatiche determinanti l'infezione e lo sviluppo della malattia non sono ancora definite, in qanto attacchi piuttosto gravi sono stati notati anche in annate con clima ritenuto sfavorevole per lo sviluppo del fungo (13). In Sicilia, secondo ricerche svolte da Graniti (9, 10, 11, 12, 13 e 14), la malattia si nota già nella seconda metà di ottobre, mentre assume il massimo sviluppo nel mese di novembre; in annate con clima mite e umido

si possono notare attacchi anche su olive verdi (14). In provincia di Reggio Calabria (Piana di Gioia Tauro, zona collinare di Polistena, zona montana dell'Aspromonte) ed in provincia di Cosenza (zona di Castrovillari) le prime infezioni avvengono, nelle zone pianeggianti, all'invaiatura dei frutti (ottobre) e in collina 15—30 giorni più tardi (16).

Nel nostro Paese e nell'URSS contrariamente alle altre zone di diffusione del patogeno, sono stati osservati attacchi anche su organi vegetativi della pianta (rametti e foglie), con conseguente deperimento e disseccamento degli stessi (16, 18, 19). Sulle foglie si notano, lungo il margine della lamina fogliare, zone decolorate con macchie di colore bruno-cuoio.

L'agente patogeno della „lebbra", identificato e descritto come nuova specie (*Gloeosporium olivarum* Alm.), è risultato, secondo più recenti studi (6, 8) identico a *Gloeosporium fructigenum* Berk., forma conidica della *Glomerella cingulata* (Atk.) Spaulding e v. Schrenk, agente del marciume amaro dei frutti di melo, per cui è stata proposta la denominazione di *G. fructigenum* Berk. f. *olivarum* (Alm.) Gorter comb. nov. (8).

La lotta contro questo parassita è attualmente in fase di sperimentazione: alcuni risultati indicativi sono stati ottenuti con poltiglia bordolese all'1 % e con prodotti fungicidi a base di zineb alla dose dello 0,1—0,2 % (14), ma al momento attuale non esistono dati sufficienti a dare un chiaro indirizzo per la difesa delle olive. Da vari AA. ormai è sentita la necessità di dover intervenire contro questa fitopatia, essendo di notevole entità i danni derivanti alla produzione olivicola in seguito all'attacco del patogeno e data la forte diffusione che presenta il *G. olivarum* nelle zone in cui è presente.

La messa a punto di un qualsiasi metodo di lotta razionale contro tale malattia è condizionata, oltre che dalla esistenza di fitofarmaci efficaci, dall'esatta conoscenza del ciclo biologico del patogeno — dalla germinazione dei conidi sulle drupe, all'infezione ed all'evasione della „lebbra" —. Per tale motivo sono state intraprese presso il nostro Laboratorio ricerche dirette allo studio dell'agente patogeno della malattia, sia „in vitro" che „in vivo" su olive recise.

PARTE SPERIMENTALE

1. Isolamento del patogeno

I tentativi di isolamento hanno avuto inizio nel dicembre 1957 utilizzando drupe di olivo colpite da „lebbra" raccolte direttamente in Calabria (Gioia Tauro), presentanti larghe zone di avvizzimento dell'epicarpo, sulla cui superfice erano presenti i corpi fruttiferi del melanconiale (gli acervuli), ricoperti di una massa gelatinosa di colore rossastro, costituita da fruttificazioni del *G. olivarum* (conidi).

L'isolamento è stato effettuato su agar-nutritivo (agar = g 20; estratto di carne Liebig = g 3; peptone Costantino = g 5; NaCl = g 5; aqua distillata = cc 1.000), in scatole Petri del diametro di cm 8, con la nota tecnica delle diluizioni successive: le scatole sono state incubate alla temperatura di 21 °C., in termostato. A distanza di 5 giorni dalla semina, quando sulla

superficie dell'agar erano presenti colonie di colore grigio-brunastro, riferibili a *G. olivarum* Alm. per la presenza di conidi (fig. 2) e di acervuli, si è proceduto allo isolamento in coltura pura del fungo, trasferendo frammenti di colonie in tubi di Potato-dextrose agar Difco. L'identificazione del patogeno è stata completata dalla prova di patogenicità, mediante inoculazione di olive sane, precedentemente sterilizzate con soluzione di ipoclorito di calcio all'1 % e lavate accuratamente e ripetutamente con acqua distillata sterile. Dopo 10 giorni di incubazione a 21 °C., in corrispondenza dei punti di inoculo si è formata una depressione e successivamente sono comparse le fruttificazioni conidiche del *G. olivarum*. Da queste olive è stato reisolato il parassita sempre su Potato-dextrose agar Difco.

Fig. 2. Conidi di *G. olivarum* Alm., da coltura su agar nutritivo in scatola Petri, a distanza di 5 giorni dalla semina (× 340)

Isolamenti da pezzi di lembo fogliare, prelevati da foglie su rami presentanti sintomi di disseccamento, e da frammenti di peduncoli di olive infette, hanno dato luogo a sviluppo di colonie di *G. olivarum*.

2. Ricerca del piu idoneo substrato artificiale per l'allevamento del *G. olivarum* e per la produzione di conidi

Si è proceduto quindi alla recerca del più adatto substrato nutritivo per l'allevamento del *G. olivarum*. Per questo studio sono stati adoperati i seguenti substrati:

1. Corn meal agar B 386 Difco;
2. Mycological agar B 405 Difco;
3. Malt agar B 24 Difco;
4. Agar Czapek-Dox modif. ($NaNO_3$ = g 2; K_2HPO_4 = g 1; $MgSO_4 \cdot 2\,H_2O$ = g 0,5; KCl = g 0,5; $FeSO_4$ = g 0,01; glucosio = g 20; agar = g 20; acqua distillata = cc 1.000);
5. Potato dextrose agar B 13 Difco;
6. Lima bean agar B 117 Difco;
7. Agar decotto di carote saccarosato;

8. D. P. Y. Medium (glucosio = g 10; peptone Costantino = g 5; Yeast Extract Difco = g 1; agar = g 20; acqua distillata = cc 1.000; pH = 6,8) (22);
9. Prune agar B 115 Difco.

Tabella 1

Sviluppo, produzione di conidi e di acervuli in *G. olivarum*, allevato, in scatola Petri, su diversi substrati

Substrato	21 °C.			26 °C.		
	sviluppo micelico	produzione di conidi	produzione di acervuli	sviluppo micelico	produzione di conidi	produzione di acervuli
Corn meal agar	++	×	—	+++	×	—
Mycological agar	++	×××	Δ	+++	0	—
Malt agar	+++	×××	—	++	×	—
Agar CZAPEK-DOX modif.	+	×××	Δ	++	×××	—
Potato-dextrose agar	++	×××	Δ	+++	×××	Δ
Lima bean agar	++	×××	Δ	++	×××	Δ
Agar decotto di carote ..	+++	×	—	+++	××	—
D. P. Y. Medium	+++	××	Δ	+++	×	—
Prune agar	+++	×××	—	+++	×	—

\+ = scarso sviluppo del micelio
++ = medio sviluppo del micelio
+++ = notevole sviluppo del micelio
0 = nessuna produzione di conidi
× = scarsa produzione di conidi
×× = media produzione di conidi
××× = notevole produzione di conidi
— = nessuna produzione di acervuli
Δ = produzione di acervuli

In ogni scatola Petri del diametro di cm 8 sono stati versati cc 20 di substrato nutritivo e dopo la solidificazione si è proceduto alla semina, distribuendo con spatola di vetro cc 0,8 di una sospensione conidica (50.000 conidi per cc) su tutta la superficie; le scatole sono state incubate a 21 °C. e 26 °C. per 6 giorni: dopo tale periodo sono stati rilevati i risultati.

Nella Tabella 1 si riportano i dati relativi allo sviluppo del micelio, alla produzione dei conidi ed alla presenza di acervuli. Per quanto riguarda il tipo di sviluppo ed il colore del micelio è stato notato quanto segue:

1. Corn meal agar:
   21 °C.: micelio di color grigio, immerso nell'agar, ed aereo di color bianco.
   26 °C.: micelio di color grigio scuro in profondità (fig. 3).
2. Mycological agar:
   21 °C.: micelio biancastro in profondità; micelio aereo lanuginoso, con addensamenti sparsi — del diametro di cm 0,5 — di color bianco.
   26 °C.: micelio di color bruno in profondità con piccoli addensamenti di colore più intenso (fig. 3).
3. Malt agar:
   21 °C.: micelio biancastro in profondità con addensamenti sparsi del diametro di cm 0,2.

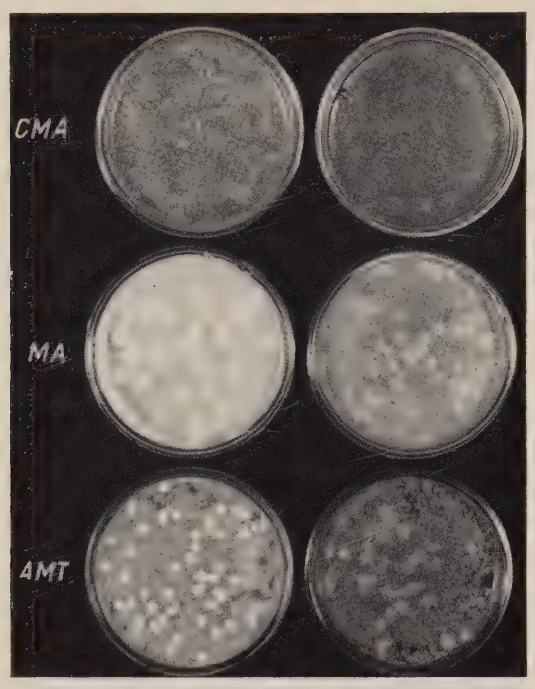


Fig. 3. Aspetto dello sviluppo di *G. olivarum* Alm. su diversi substrati nutritivi a 21 °C. (a sinistra) e a 26 °C. (a destra): CMA = Corn meal agar Difco; MA = Mycological agar Difco; AMT = Malt Agar Difco

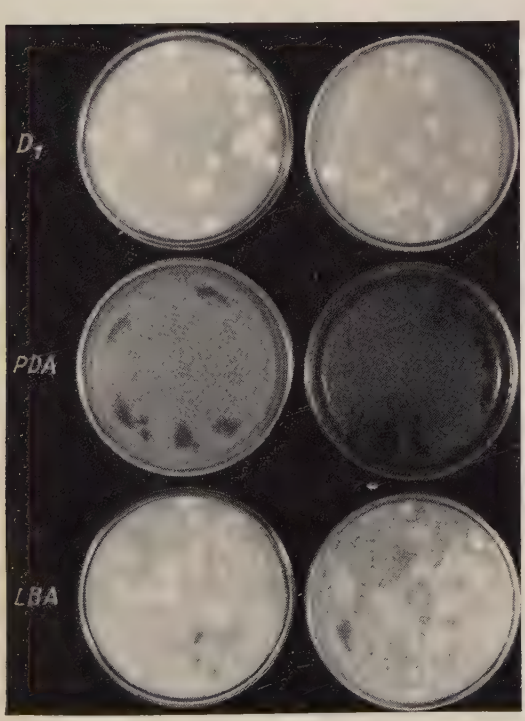


Fig. 4. Aspetto dello sviluppo di *G. olivarum* Alm. su diversi substrati nutritivi a 21 °C. (a sinistra) e a 26 °C. (a destra): D 1 = Agar Czapek-Dox modif.; PDA = Potato dextrose agar Difco; LBA = Lima bean agar Difco

26 °C.: micelio bruno nerastro in profondità con addensamenti di colore più chiaro del diametro di cm 0,2 (fig. 3).

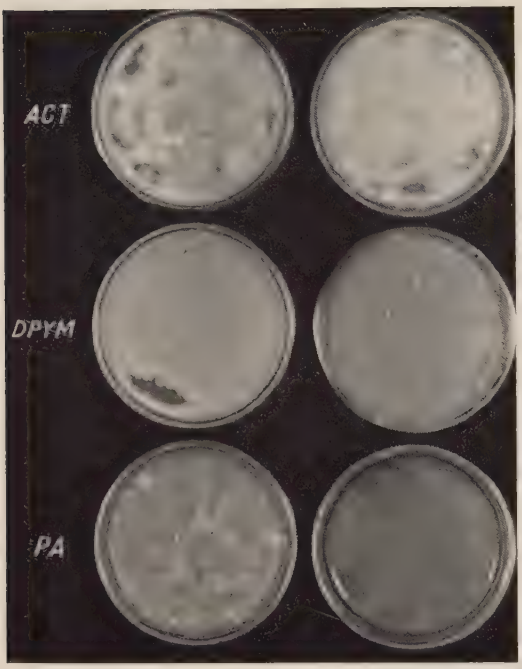


Fig. 5. Aspetto dello sviluppo di *G. olivarum* Alm. su diversi substrati nutritivi a 21 °C. (a sinistra) e a 26 °C. (a destra): ACT = Agar decotto di carote; DPYM = D. P. Y. medium; PA = Prune agar DIFCO

4. Agar Czapek-Dox modif.:
   21 °C.: micelio grigio verdastro in profondità con addensamenti aerei di colore bianco grigio del diametro di cm 0,5; acervuli ricoperti da una massa gelatinosa di color roseo.
   26 °C.: micelio di color bianco in profondità (fig. 4).
5. Potato-dextrose agar:
   21 °C.: micelio di color nocciola in profondità; micelio biancastro in superficie.
   26 °C.: micelio grigiastro in profondità e grigio-scuro in superficie.
   Per entrambe le temperature: acervuli ricoperti da massa gelatinosa nerastra (fig. 4).
6. Lima bean agar:
   21 °C.: micelio di color grigio in profondità e biancastro in superficie.
   26 °C.: micelio di color grigio in profondità e grigio scuro in superficie.
   Per entrambe le temperature: acervuli ricoperti da massa gelatinosa arancione (fig. 4).
7. Agar decotto di carote saccarosato:
   21 °C.: micelio di color bruno verdastro in profondità; in superficie micelio biancastro in piccoli addensamenti.
   26 °C.: micelio di color nocciola in profondità e di color grigio in superficie (fig. 5).
8. D. P. Y. Medium:
   21 °C.: micelio verde olivaceo in profondità ed in superficie.
   26 °C.: micelio biancastro in profondità; addensamenti puntiformi di micelio aereo di color bianco (fig. 5).

9. Prune agar:
   21 °C.: micelio di color grigio bruno in profondità.
   26 °C.: micelio di color grigio scuro in profondità (fig. 5).

3. Influenza della temperatura e dell'età della coltura sulla produzione di conidi su substrato artificiale

Mentre lo sviluppo micelico del *G. olivarum* non dipende strettamente dalle condizioni di temperatura, la produzione dei conidi è invece influenzata da tale fattore. Precedentemente avevamo notato che su Potato-dextrose agar Difco la produzione di tali organi è molto elevata, maggiore alla temperatura di 21 °C. Abbiamo voluto avere una misura di tale fenomeno, anche in funzione della età della coltura, in quanto avevamo bisogno di disporre di quantitativi notevoli di conidi per la messa a punto di un metodo di riproduzione della „lebbra" su olive recise, in ambiente condizionato. Si è proceduto quindi alla valutazione nel tempo della produzione di conidi da colture del fungo su Potato-dextrose agar Difco, allevate a temperature diverse (16 °, 21 °, 26 ° e 30 °C.).

I conidi prodotti alle quattro temperature da colture di 1, 2, 3, 4 e 5 giorni di età sono stati sospesi in acqua sterile (cc 5 per ogni tubo di coltura) e il loro numero è stato valutato al microscopio, mediante conteggi con l'ematocimetro Thoma. I singoli valori per ogni tubo di coltura, riportati nella fig. 6, per ogni temperatura e per ogni età, sono dati dalla media dei valori di 3 colture, di cui si era valutato singolarmente il numero totale dei conidi.

La sporulazione è fortemente influenzata dalla temperatura di allevamento del fungo: la massima quantità di conidi, per ogni età delle colture, è prodotta a 21 °C.; la minima a 30 °C., inoltre la produzione di conidi, per ciascuna temperatura, aumenta con l'età della coltura.

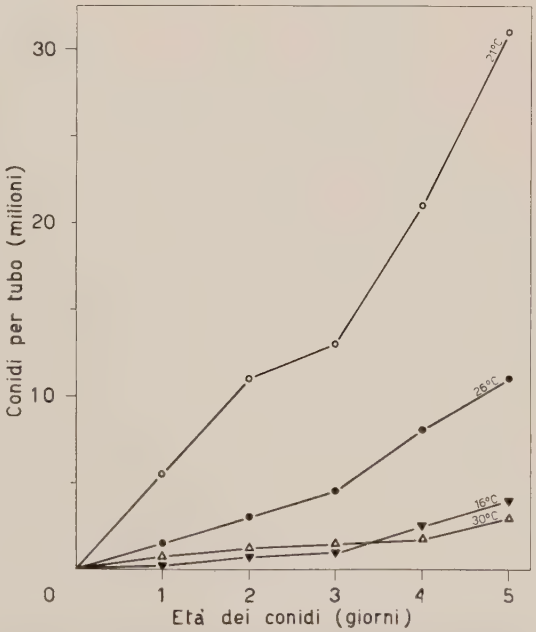


Fig. 6. Influenza della temperatura di incubazione e dell'età delle colture sulla produzione di conidi di *G. olivarum* Alm. su Potato dextrose agar Difco

4. Influenza della temperatura sulla germinazione dei conidi

L'influenza della temperatura sul processo infettivo si manifesta, nella prima fase di esso, attraverso tre modalità: 1. sulla percentuale di germinazione; 2. sulla velocità di germinazione; 3. sullo

sviluppo del tubo promicelico (7). Mentre i primi due punti riguardano esclusivamente il processo di germinazione, indipendentemente dalle reazioni dello ospite, lo sviluppo del tubo promicelico è strettamente connesso con il fenomeno di penetrazione del patogeno nei tessuti dell'ospite e, quindi, esso è influenzato dalla disponibilità di adatti elementi nutritivi presenti nei tessuti verso cui si svolge l'azione parassitaria del fungo.

a) Allestimento delle colture ed età dei conidi

Poichè è noto che la sensibilità dei conidi alla temperatura nella fase di germinazione diminuisce con la loro età, e cioè con la loro vitalità (7), abbiamo creduto opportuno svolgere lo studio sull'influenza della temperatura su conidi di eguale età e di elevata vitalità.

Per stabilire l'età più adatta, tenendo conto della temperatura di allevamento del patogeno, si è proceduto nel modo seguente:

sono state preparate delle colture di *G. olivarum* su Potato-dextrose agar Difco in tubi da batteriologia del diametro interno di mm 15: tali colture sono state incubate in termostato alle temperature di 16 °, 21 °, 26 ° e 30 °C., effettuando dei trapianti sullo stesso substrato preparato di fresco ogni quattro giorni; da colture di 2, 3, 4, 5 e 6 giorni di età (dal momento del trapianto) sono stati prelevati i conidi e messi a germinare in acqua su vetrino, alle temperature di 21 ° e 26 °C. per 16 ore.

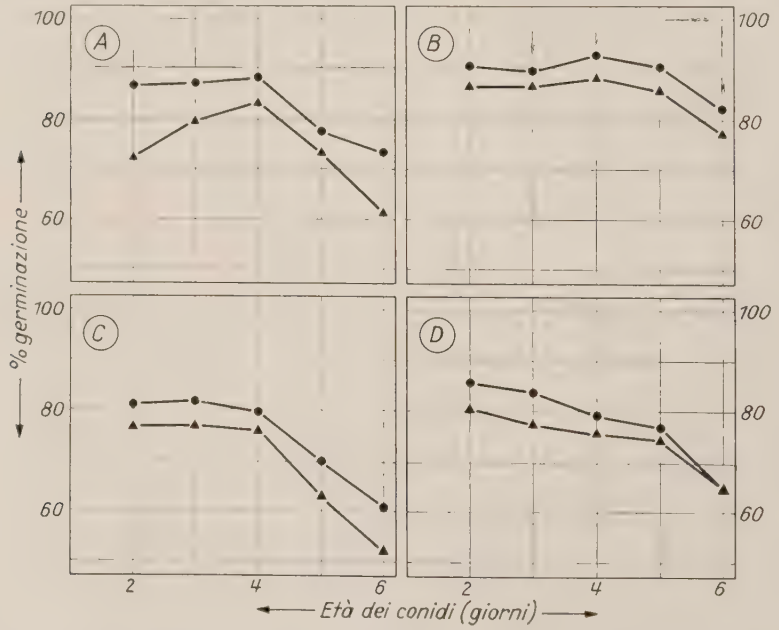


Fig. 7. Influenza dell'età dei conidi e della temperatura di allevamento del *G. olivarum* Alm. sulla percentuale di germinazione a 21 °C. (▲———▲) e 26 °C. (●———●) su vetrino. A = conidi prodotti a 16 °C.; B = conidi prodotti a 21 °C.; C = conidi prodotti a 26 ° C.; D = conidi prodotti a 30 °C.

I risultati, riportati nella fig. 7, hanno messo in rilievo che la maggiore percentuale di germinazione è fornita da conidi di 4 giorni di età ottenuti da colture allevate a 16 ° e 21 °C., di 3 giorni di età per le colture allevate a 26 °C. e di 2 giorni di età per le colture allevate a 30 °C. La maggior percentuale di germinazione (92 %) è stata ottenuta a 26 °C. con conidi provenienti da colture allevate a 21 °C.

b) Tecnica dei saggi

La sospensione dei conidi è stata preparata in acqua distillata sterile: dopo aver versato l'acqua nei tubi di coltura, con un'ansa di platino è stata grattata la parte superficiale della coltura in modo che i conidi si potessero diffondere nel mezzo liquido; la sospensione derivante è stata filtrata su lana di vetro, per eliminare i frammenti di micelio staccatisi dalla coltura, valutandone poi la densità mediante conteggi effettuati al microscopio con ematocimetro Thoma.

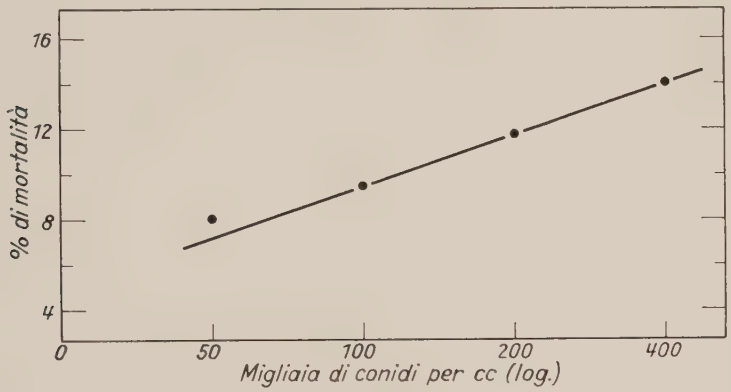


Fig. 8. Influenza della densità di inoculo sulla germinazione di conidi di *G. olivarum* Alm. su vetrino a 26 °C.

Per l'esecuzione dei saggi la densità dei conidi è stata portata, mediante aggiunta di acqua sterile, ad un valore di 50.000 conidi per cc. A tale densità è stata accertata la più bassa mortalità naturale dei conidi di 4 giorni di età prelevati da colture allevate a 21 °C., in gocce di acqua su vetrino (fig. 8); infatti una maggiore concentrazione dei conidi riduce la germinazione degli stessi, come è stato dimostrato per altri funghi (17). Non si sono prese in considerazione valori di densità conidica più bassi, in quanto sarebbe stato molto più laborioso il conteggio dei conidi germinati, nel corso dei saggi, dovendosi esplorare più campi microscopici per ogni goccia.

Sono stati utilizzati vetrini speciali da microscopia (mm 23 × mm 75), sulla cui superficie sono presenti zone circolari del diametro di mm 9, delimitate da una corona circolare smerigliata; su ogni vetrino sono presenti 4 zone circolari. Su ciascuna di tali zone sono state deposte gocce di sospensione conidica (cc 0,05): tre vetrini così seminati sono stati posti in camera umida, costituita da una scatola Petri, del diametro di mm 140 e alta mm 24,

rovesciata in modo da costituire una camera a tenuta, essendo presente sul fondo dell'acqua sterile. I vetrini sono stati collocati su di un supporto costituito da una lastrina di vetro di mm 10 di larghezza, ripiegata ad „U", in modo che occupassero il centro del volume della scatola. La lettura dei risultati è stata effettuata al microscopio (× 100), conteggiando 25 conidi per ogni area circolare (100 conidi per vetrino). I valori riportati nel presente lavoro sono la media di letture effettuate su un numero di conidi non inferiore a 300.

c) Percentuale di germinazione a diverse temperature

Il nostro esame ha avuto lo scopo di determinare l'influenza della temperatura sulla percentuale di germinazione dopo uguale periodo di incubazione per conidi ottenuti da colture allevate a 16 °, 21 °, 26 ° e 30 °C. rispettivamente di 4, 4, 3 e 2 giorni di età. E' stato scelto un tempo di incubazione di 16 ore, poichè dopo tale periodo era stata osservata, in saggi preliminari, la massima percentuale di germinazione alla temperatura ottimale (26 °C.).

I risultati sono riportati nella fig. 9.

Per quanto riguarda la modalità di germinazione è da rilevare che il conidio emette da un apice un tubo promicelico e dall'altro una clamidospora (di grandezza uguale al diametro minore del conidio), a membrana ispessita (fig. 10).

La formazione della clamidospora è successiva alla emissione del tubo promicelico; essa si verifica quando il tubo promicelico ha raggiunto una lunghezza pari a 5—6 volte quella del diametro maggiore del conidio. La lunghezza del tubo promicelico è risultata massima alla temperatura di 26 °C.

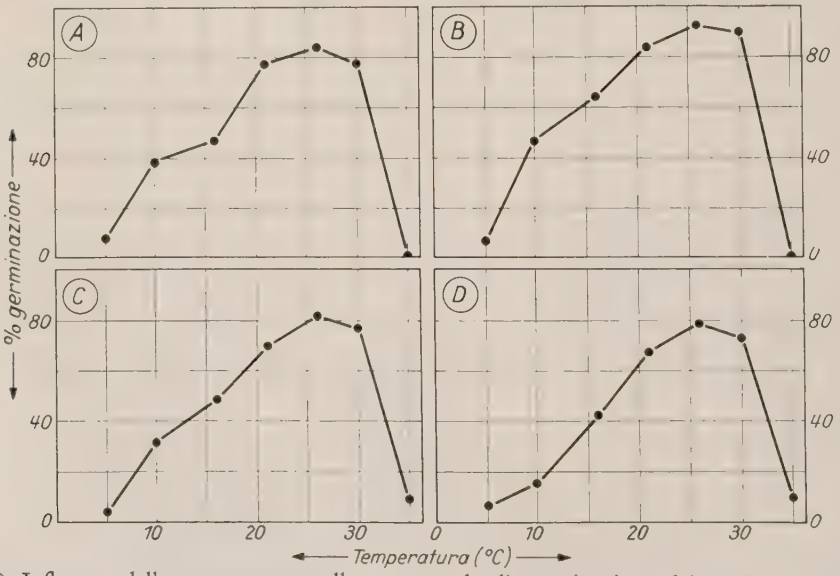


Fig. 9. Influenza della temperatura sulla percentuale di germinazione dei conidi di *G. olivarum* Alm., prodotti a temperature diverse: A = conidi prodotti a 16 °C.; B = conidi prodotti a 21 °C.; C = conidi prodotti a 26 °C.; D = conidi prodotti a 30 °C.

Fig. 10. Conidi di *G. olivarum* Alm. germinati in acqua distillata su vetrino, dopo 16 ore di incubazione a 26 °C. (× 340)

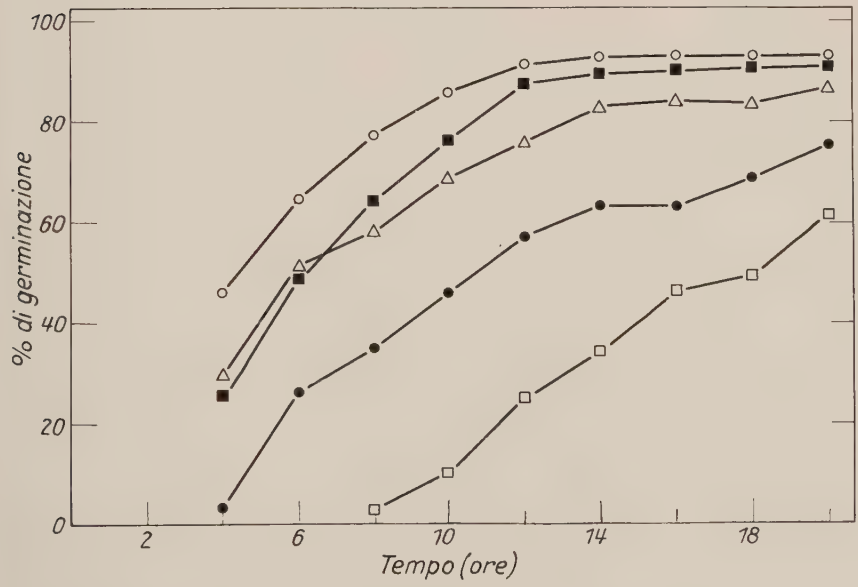


Fig. 11. Velocità di germinazione dei conidi di *G. olivarum* Alm. a diverse temperature su vetrino. □———□ = 10 °C.; ●———● = 16 °C.; ■———■ = 21 °C.; ○———○ = 26 °C; Δ———Δ = 30 °C.

d) Velocità di germinazione

L'influenza della temperatura oltre che sulla percentuale di germinazione si manifesta sulla velocità di germinazione dei conidi del patogeno, espressa come percentuale di conidi germinati in successivi eguali intervalli di tempo.

Questa ricerca è stata svolta con conidi prelevati da colture di 4 giorni di età allevate a 21 °C.; sono stati effettuati conteggi dei conidi germinati a distanza di 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 ore dalla semina degli stessi sui vetrini. L'inizio della germinazione è rapido (tra 2 e 4 ore dopo la semina) per i conidi esposti a 16 °, 21 °, 26 ° e 30 °C. (fig. 11), mentre a 10 °C. la germinazione ha inizio tra 6 e 8 ore dopo la semina. Il 50 % della germinazione si realizza 4 ore e mezza dopo la semina a 26 °C., dopo 6 ore a 21 ° e 30 °C., dopo 11 ore a 16 °C. e dopo 18 a 10 °C.

5. Influenza della luce sulla germinazione dei conidi

Sono stati impiegati conidi prodotti a 21 °C. La sorgente luminosa è stata fornita da tubi fluorescenti Philips TL 55, 40 W, con una intensità luminosa di 1335 lumen per m^2.

Dopo un periodo di 8 ore di esposizione alla luce, dal momento della semina, i conidi di una prima serie di vetrini sono stati portati al buio per

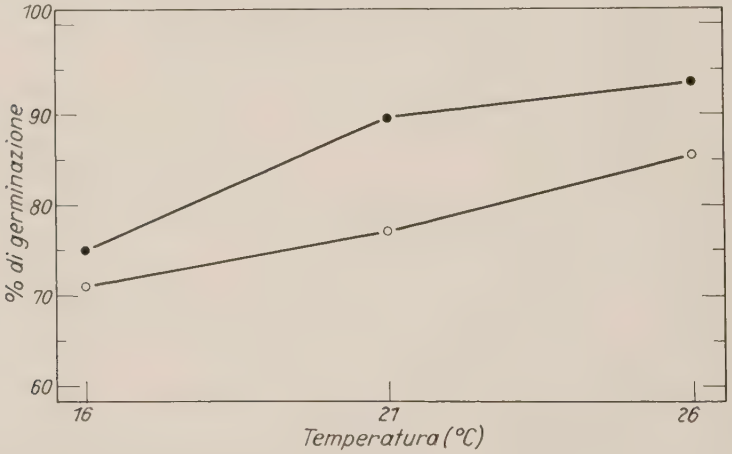


Fig. 12. Influenza della luce artificiale sulla germinazione „in vitro" dei conidi di *G. olivarum* Alm., in funzione della temperatura: ●———● = conidi incubati al buio; ○———○ = conidi incubati alla luce

altre 8 ore; una seconda serie di vetrini è stata mantenuta per 16 ore sempre al buio. L'influenza della luce è stata valutata in funzione anche della temperatura: per tale saggio sono stati preparati tre gruppi di due serie di vetrini al fine di studiare il fenomeno alle temperature di 16 °, 21 ° e 26 °C. Dai risultati, il cui grafico è riportato nella fig. 12, emerge la scarsa influenza esercitata da tale tipo di luce sulla percentuale di germinazione dei conidi; la sua azione si è manifestata con una leggera depressione della germinazione.

6. Influenza del pH dell'acqua sulla germinazione dei conidi

Sono state preparate sospensioni di conidi prodotti a 21 °C. in acqua distillata il cui pH era stato precedentemente portato, al potenziometro, ai valori desiderati, impiegando HCl (pH = 2, 3, 4, 5, 6) o NaOH (pH = 7, 8, 9, 10). La percentuale dei conidi germinati è stata valutata dopo 16 ore di incubazione dei vetrini a 26 °C.: i risultati sono esposti nel grafico della fig. 13. Il *G. olivarum* non ha risentito l'influenza della concentrazione idrogenionica dell'acqua per valori compresi tra 4 e 8; a pH = 3, 9, 10 la percentuale di germinazione è risultata compresa tra il 60 ed il 70 %, mentre una reazione fortemente acida (pH = 2) ha inibito completamente la germinazione.

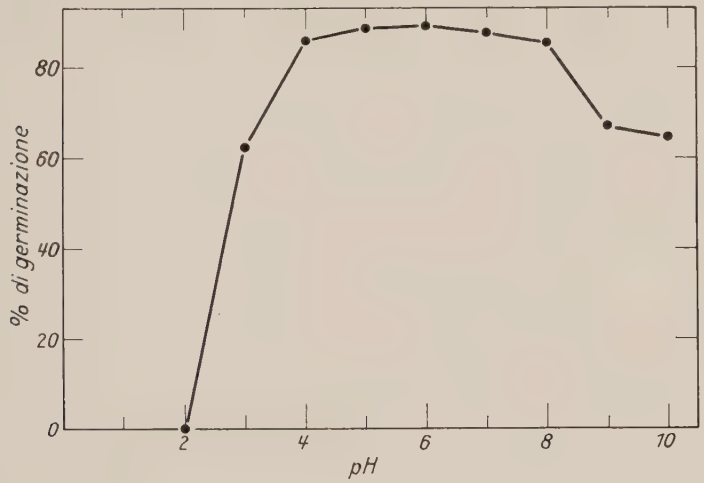


Fig. 13. Influenza del pH sella germinazione „in vitro" dei conidi di *G. olivarum* Alm., incubati a 26 °C. per 16 ore

7. Influenza della temperatura sulla vitalità dei conidi, esposti in ambiente secco per vari periodi di tempo

Utilizzando conidi di 4 giorni di età, prelevati da colture su Potato-dextrose agar Difco, incubate a 21 °C., sono stati preparati vetrini, come indicato a pag. 10. Subito dopo si è fatta asciugare la goccia di acqua della sospensione mediante corrente di aria, quindi i vetrini sono stati collocati in termostati regolati a temperature comprese tra 5 ° e 35 °C. A vari intervalli di tempo, sono stati prelevati, per ciascuna temperatura in prova, gruppi di vetrini (3 per ogni tesi) sui quali sono state aggiunte piccole quantità di acqua sterile (cc 0,05) in corrispondenza di ciascuna zona occupata dai conidi, in modo da riportare questi in sospensione nell'acqua e quindi nella possibilità di germinare. Successivamente i vetrini così trattati sono stati incubati in camera umida alla temperatura di 26 °C. (in termostato), ottimale per la germinazione dei conidi, ed ivi mantenuti per 24 ore, in modo da

Tabella 2

Percentuale di germinazione dei conidi in acqua a 26° C. dopo 24 ore, precedentemente esposti a secco a varie temperature

Tempo di espositione (minuti)	Percentuale di germinazione						
	Temperature di esposizione (° C.)						
	5	10	16	21	26	30	35
15	72,7			87,4	70,0	71,4	64,4
30	63 0	66,0		84,4	67,7	60,4	61,4
45	54,7			81,0	60,7	58,0	51,4
60	54,4	62,0	79,4	77,4	58,7	52,0	34,0
75	51,0			64,7	56,0	52,0	17,0
90	46,7	58,7		63,0	53,4	37,7	13,0
105	43,7			59,0	53,4	31,4	4,4
120	39,7	48,0	71,7	53,0	41,0	21,7	5,0
135	40,0			48,4	39,0	14,7	
150	37,7	43,0					
180			65,7				
210		37,7					
240			58,0				
270		35,0					
300			55,0				
330		30,4					
360			48,4				
390		25,0					
420			45,7				
450							
480			43,4				

ottenere la massima germinazione possibile. I risultati sono riportati nella tabella 2.

Per ciascuna temperatura è stato calcolato il tempo di esposizione necessario per determinare il 50 % di inibizione della germi-

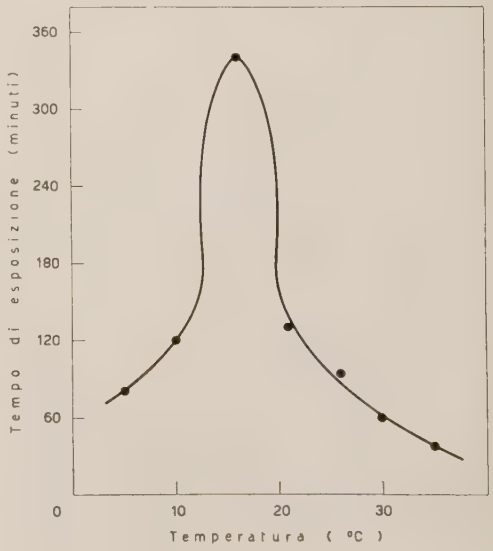


Fig. 14. Curva dei TL 50 (tempo di esposizione in ambiente secco necassario per redurre del 50 % la germinazione) di conidi di *G. olivarum* Alm., in funzione della temperatura

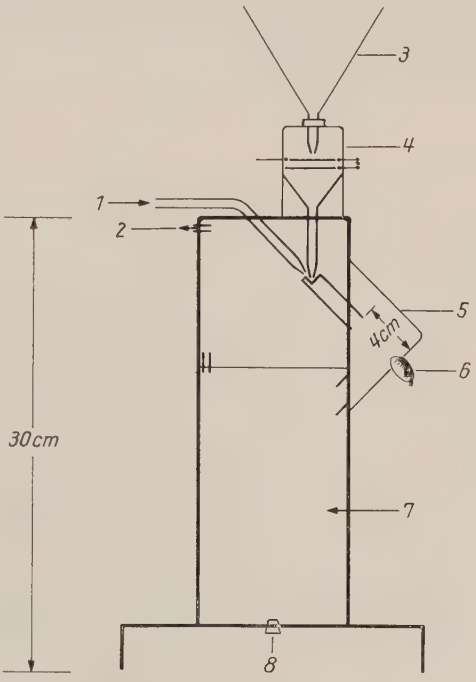
nazione: il grafico è riportato nella fig. 14. A 16 °C. i conidi del patogeno si sono dimostrati meno sensibili all'azione della temperatura. Sono stati effettuati alcuni saggi esplorativi su conidi prelevati da colture allevate a 26 ° e a 30 °C., conseguendo sempre gli stessi resultati.

8. Influenza della temperatura sull'infezione delle olive, sullo sviluppo della „lebbra" e sulla sporulazione del patogeno „in vivo"

a) Tecnica di infezione

Olive recise della cv. Leccino sono state ferite all'apice insuffiando sopra di esse, con violenza, un getto di polvere di carborundum (diametro medio dei granuli = μ 100), mediante corrente di aria alla pressione di atm. 1—1,5, da un ugello collocato alla distanza di cm 4 dall'apice della drupa. Con questo procedimento si provocano delle microlesioni sulla superficie dell'epicarpo visibili soltanto al microscopio. L'apparecchio utilizzato per l'infezione delle olive è schematizzato nella fig. 15.

Dopo tale operazione le olive, capovolte, sono state infilate in vaschette di politene del diametro di mm 15 e della profondità di mm 8, riempite di una sospensione acquosa di conidi di *G. olivarum* di densità pari a 500 000 conidi per cc (la sospensione dello inoculo è stata ottenuta raccogliendo conidi da colture a striscio su Potato-dextrose agar Difco, allevate per 4 giorni a 21 °C. in termostato). Le vaschette contenenti le olive sono state sistemate su appositi supporti (fig. 16) ed incubate in camera umida (scatola Petri) in termostati regolati alle temperature di 10, 15, 20, 25 e 30 °C. per 48 ore. Dopo tale periodo di tempo le olive sono state asciugate, sistemate su supporti in modo che l'apice fosse ri-



1 = Entrata aria
2 = Uscita aria
3 = Serbatoio carborundum
4 = Dosatore " "
5 = Protezione in materiale trasparente con foro per le olive
6 = Oliva
7 = Serbatoio per carborundum utilizzato
8 = Tappo per recupero carborundum

Fig. 15. Rappresentazione schematica dell'apparecchio utilizzato per la produzione delle lesioni sull'epicarpo delle drupe

Fig. 16. Supporto per la sistemazione delle drupe durante il periodo di infezione

volto, all'insù ed incubate in termostato, in ambiente asciutto alla stessa serie di temperature. Per ciascuna temperatura sono state preparate 5 serie di campioni di olive, ognuna delle quali, dopo l'infezione, è stata incubata ad una diversa temperatura. Mediante letture periodiche si è seguito lo sviluppo della „lebbra", tenendo conto della percentuale delle olive infette, del grado di sviluppo della malattia e della data di comparsa degli acervuli sulle drupe.

b) Risultati

I risultati sono riportati nella tabella 3. Ogni serie è costituita da 16 olive (fig. 17). La percentuale delle olive infette è compresa tra 75 e il 100 % per i campioni infettati ed incubati alle 5 diverse temperature in esame; il più rapido sviluppo della „lebbra" è stato notato alle temperature di 15, 20 e 25 °C.; gli acervuli si sono formati più rapidamente a 20 °C. A 30 °C. non sono stati notati acervuli per il successivo raggrinzimento e disidratazione delle drupe ammalate. La relazione esistente tra temperatura di incubazione delle olive e periodo di tempo necessario per la formazione delle fruttificazioni del patogeno è illustrata nel grafico della fig. 18.

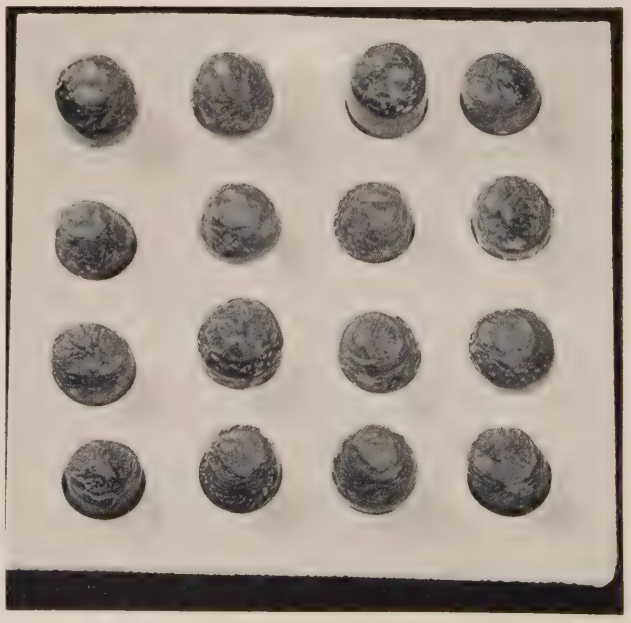


Fig. 17. Olive cv. Leccino infettate artificialmente con conidi di *G. olivarum* Alm. ed incubate in termostato a 25 °C. per 5 giorni

Tabella 3

Influenza della temperatura sull'infezione, sullo sviluppo della „lebbra" e sulla formazione degli acervuli di *G. olivarum*, su olive recise

Serie No.	Temperatura durante l'infezione (° C.)	Temperatura durante l'incubazione (° C.)	Percentuale di olive con „lebbra" a distanza di 9 giorni dalla infezione	Entita' dello sviluppo della „lebbra" dopo 9 giorni	Periodo di tempo (gg) compreso tra l'inoculazione e la comparsa degli acervuli
1	10	10	100,0	+	23
2	10	15	81,0	+++	9
3	10	20	100,0	+++	6
4	10	25	100,0	+++	7
5	10	30	100,0	++	Δ
6	15	10	81,0	+	23
7	15	15	100,0	+++	9
8	15	20	100,0	+++	6
9	15	25	100,0	+++	7
10	15	30	100,0	++	Δ
11	20	10	100,0	+	23
12	20	15	94,0	+++	9
13	20	20	94,0	+++	6
14	20	25	94,0	+++	7
15	20	30	87,5	++	Δ
16	25	10	87,5	+	23
17	25	15	100,0	+++	9
18	25	20	100,0	+++	6
19	25	25	94,0	+++	7
20	25	30	87,5	++	Δ
21	30	10	94,0	+	23
22	30	15	81,0	+++	9
23	30	20	94,0	+++	6
24	30	25	75,0	+++	7
25	30	30	94,0	++	Δ

\+ = Increspature su 1/4 della superfice della drupa.
++ = Increspature su 1/2 della superfice della drupa.
+++ = Increspature su 3/4 della superfice della drupa.
Δ = Le olive dopo il 9 ° giorno si sono avvizzite e disidratate completamente.

9. Influenza della persistenza dell'acqua sulle drupe sulla percentuale di attecchimento della „lebbra"

Drupe recise della cv. Leccino sono state infettate nel modo descritto nel precedente paragrafo ed incubate in termostato alle temperature di 15, 20 e 25 °C. A distanza di 2, 4, 6, 8 e 24 ore le olive sono state asciugate

ed incubate alla stessa temperatura di infezione, sempre in termostato. A distanza di 8 giorni dall'inoculazione si sono rilevate le percentuali di olive ammalate. I risultati sono riportati nella tabella 4. Ciascuna serie è costituita da campioni di 16 olive.

Tabella 4

Influenza della persistenza dell'acqua sulle drupe sull'attecchimento del patogeno

Serie No.	Temperatura di infezione e di incubazione (° C.)	Periodo di tempo (ore) durante il quale le olive sono rimaste bagnate	Percentuale di olive colpite da „lebbra"
1	15	2	0,0
2	15	4	18,7
3	15	6	43,8
4	15	8	62,5
5	15	24	67,9
6	20	2	6,2
7	20	4	25,0
8	20	6	87,5
9	20	8	83,7
10	20	24	100,0
11	25	2	18,7
12	25	4	75,0
13	25	6	81,2
14	25	8	93,7
15	25	24	100,0

10. Influenza del grado di maturazione delle olive sull'attecchimento e lo sviluppo „in vivo" del *G. olivarum*

Utilizzando il metodo di inoculazione descritto nel paragrafo 8, è stata tentata la riproduzione della „lebbra" su olive recise ccv. Leccino e Frantoio, ancora verdi. Tali tentativi hanno avuto inizio sino dai primi di agosto. Le olive inoculate sono state mantenute per 24 ore a 25 °C. in termostato (camera umida) e poi trasferite a 20 °C., sempre in termostato, sia in presenza di umidità satura che in ambiente asciutto.

Operando in tal modo non è stato possibile riprodurre la malattia. Contemporaneamente a tali saggi di inoculazione, si sono sezionate delle drupe e si è seminata, direttamente sulla polpa, una sospensione conidica del patogeno. Su tali olive, mantenute in camera umida a 25 °C. in termostato, non si è mai notato alcuno sviluppo di micelio. L'infezione è avvenuta sol-

tanto quando le olive hanno cominciato a presentare i primi segni della invaiatura, cioè verso la metà di settembre.

Sia nel 1958 che nel 1959, è stato possibile infettare le olive verdi soltanto quando queste sono state raccolte in campo nel mese di dicembre (fig. 19).

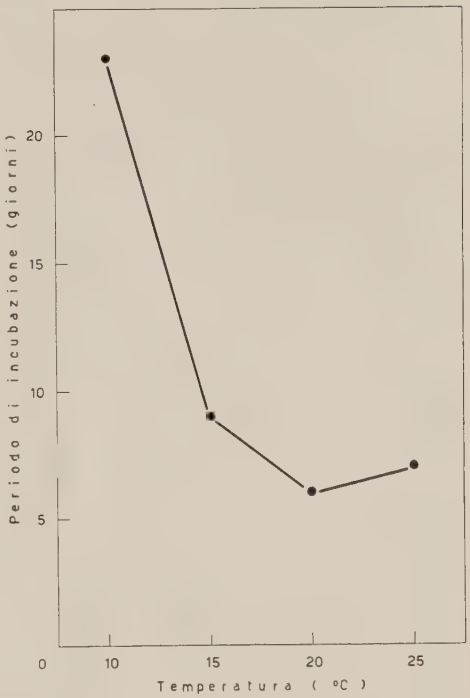


Fig. 18. Relazione fra il periodo di formazione degli acervuli del *G. olivarum* Alm. e la temperatura di incubazione delle olive infettate artifizialmente

11. Influenza della presenza di ferite sull'attecchimento dell'infezione del *G. olivarum*

Poichè il meccanismo di infezione dei conidi di *G. olivarum* non è ancora noto, non si sa esattamente, cioè, se il patogeno sia capace di perforare la cuticola della drupa o se trattasi essenzialmente di un parassita da ferita, è stato allestito un saggio di infezione su olive cv. Leccino mature, integre o precedentemente lesionate come descritto nel paragrafo 8.

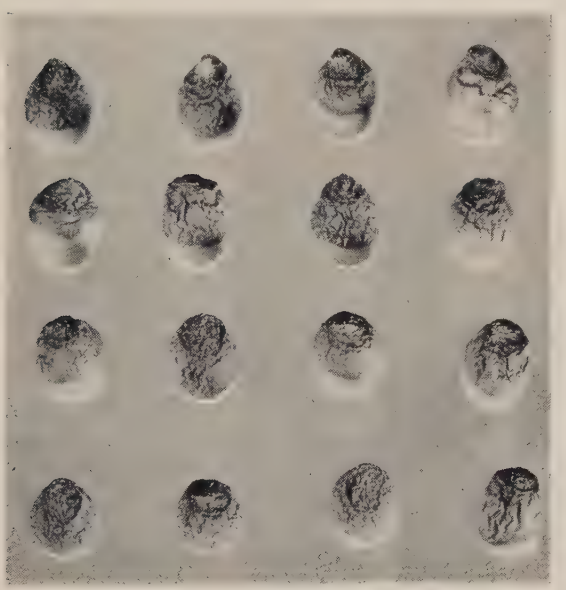


Fig. 19. Olive verdi cv. Leccino, raccolte in dicembre, colpite da „lebbra", in seguito ad infezione artificiale con conidi di *G. olivarum* Alm.

Le due serie di olive sono state inoculate e mantenute a 25 °C. per 48 ore in camera umida e in termostato, quindi trasferite a 20 °C., in ambiente asciutto. A distanza di 10 giorni dall'inoculazione, il 100 % delle olive lesionate prima della inoculazione si sono presentate ammalate, mentre su quelle inoculate senza ferite, in nessun caso si è notato sviluppo della „lebbra".

DISCUSSIONE ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Se si fa eccezione di alcuni studi di carattere biologico sull'agente patogeno della „lebbra" delle olive, *Gloeosporium olivarum* Alm., di A. BIRAGHI (2, 3), R. V. G. CABRAL (4), A. CICCARONE (5, 6), G. GORTER (8), la maggior parte della letteratura specifica sull'argomento non riporta notizie circa l'influenza dei fattori ambientali sulla germinazione dei conidi del fungo, sull'infezione e sullo sviluppo della „lebbra". Soltanto R. V. G. CABRAL (4) ha svolto ricerche sul periodo di incubazione della „lebbra" in pieno campo, a seguito di infezioni artificiali eseguite nel 1940. Molto recentemente (1959) sono state rese note alcune ricerche di D. G. ZACHOS e S. A. MAKRIS (23), svolte sia in „vitro" che „in vivo" sul *G. olivarum* e sulla „lebbra". Indirettamente abbiamo conoscenza che il *G. olivarum* è particolarmente dannoso in ambiente umido (19), che la malattia si manifesta in annate caratterizzate da temperature più miti, piogge ed elevata umidità atmosferica, per quanto non manchino indicazioni secondo le quali sembra che la „lebbra" abbia provocato danni in annate definite „poco favorevoli" allo sviluppo del fungo (13).

A pag. 72 del volume IX (1955) dell'Annuario dell'Agricoltura italiana si legge che „. . . inusitate e quasi continue piogge cadute dalla fine di agosto sino ai primi di ottobre e le elevate temperature del successivo periodo hanno provocato un disastroso attacco di *Phoma* e di *Gloeosporium*" (1): queste scarse conoscenze circa le relazioni intercorrenti tra fattori ambientali e comportamento del patogeno, ci hanno indotto a svolgere ricerche circa l'influenza esercitata da alcuni fattori, quali la temperatura, la luce e il pH, sulla germinazione dei conidi „in vitro" e quella esercitata dalla temperatura, dal grado di maturazione delle olive, dalla persistenza di acqua sulle olive, dalla presenza di lesioni sull'epicarpo, sull'attecchimento dell'infezione e sullo sviluppo della „lebbra" su olive recise, mantenute in ambiente condizionato. Ciò, onde definire, per la variabile intensità con la quale si manifesta l'azione dei fattori ambientali, i limiti entro i quali il patogeno può provocare l'infezione e dar luogo allo sviluppo della malattia.

Sono state svolte ricerche „in vitro" circa l'influenza di taluni fattori ambientali sulla germinazione dei conidi di *G. olivarum*, ciò perchè riteniamo che la modalità di svolgimento del processo di germinazione „in vitro" siano pressochè uguali a quelle che si possono verificare in natura, specialmente nel caso di microorganismi che non hanno bisogno di particolari sostanze stimolanti la germinazione, eventualmente presenti sulla superficie degli organi da colonizzare: infatti, *G. olivarum* non presenta esigenze nutritive

altamente specifiche, potendosi sviluppare su substrati artificiali organici e minerali completamente diversi, come è risultato dalle nostre esperienze e da quelle di altri Autori (5, 11).

Per la presente ricerca è stato effettuato uno studio preliminare per stabilire l'età delle colture alle quali corrispondessero conidi maturi, vitali e dotati di elevata facoltà germinativa: tale età varia a seconda della temperatura alla quale sono prodotti i conidi. A 30 °C. i conidi raggiungono la maturità entro breve intervallo di tempo dalla loro formazione, mentre a temperature più basse l'età ottimale si sposta verso i 4 giorni (21 ° e 16 °C.). L'età delle colture da cui prelevare i conidi per lo studio dell'influenza della temperatura sulla germinazione è stata fissata in base alla maggior percentuale di germinazione da essi presentata, rispetto a quelli prelevati da colture più giovani o più vecchie. Le nostre ricerche hanno messo in evidenza che *G. olivarum* germina in percentuale rilevante tra 10 ° e 30 °C. Più che altro, la temperatura esplica un'influenza sulla germinazione dei conidi accelerando o ritardando il processo stesso: conidi messi in acqua ed incubati a 16 °, 21 °, 26 ° e 30 °C. germinano tra 2 e 4 ore dopo la semina, a 10 °C. la germinazione ha inizio tra 6 e 8 ore dopo la semina. Nelle condizioni in cui si è operato, i conidi hanno presentato a 26 °C. una maggiore velocità di germinazione: già 4 ore e mezza dopo la semina, a tale temperatura, il 50 % dei conidi sono germinati. Circa i termini estremi entro cui si verifica la germinazione, è risultato che a 5 °C. soltanto il 5 % dei conidi sono germinati, mentre a 35 °C., i conidi prelevati da colture allevate a 26 ° e 30 °C. hanno presentato una germinazione del 10 %, quelli prodotti da colture allevate a 21 °C. e 16 °C., invece, sono risultati in lisi o raggrinziti, per cui si deve concludere che il limite termico massimo, vitale per *G. olivarum*, è vicino alla temperatura di 35 °C., ma che il patogeno per quanto si riferisce alla temperatura ha una grande facoltà di adattamento, il che spiega l'enorme diffusione geografica che ha avuto la malattia in tempi relativamente brevissimi.

Secondo le esperienze di Hemmi e Kurata (15) i termini estremi di temperatura, entro cui si verifica lo sviluppo del patogeno, sono rappresentati da 5 ° e 40 °C.

Secondo le ricerche di Zachos e Makris (23), gli unici ad aver svolto indagini su tale fenomeno, dopo 24 ore di incubazione dei vetrini il massimo valore di germinazione è stato ottenuto per i conidi incubati a 15 ° e 20 °C. (58 %); dopo 48 ore, la massima percentuale di germinazione è stata rilevata su conidi incubati a 15 °C. (80 %). Dopo tale periodo, a 30 °C. soltanto il 24,5 % dei conidi è germinato, a 0 °C. il 5 % e a 35 °C. lo 0 %. I valori ottenuti dai suddetti AA., inferiori a quelli da noi riscontrati, sono riferibili a conidi di 15 giorni circa di età e provenienti da colture allevate a temperatura non specificata. Si tratta in questo caso di conidi di scarsa vitalità e sensibilità, come è stato riscontrato nel corso delle ns. ricerche. Nei nostri studi, inoltre, si è visto come i termini estremi di temperature per la germinazione sono influenzati dalla temperatura di allevamento delle colture, da cui provengono i conidi stessi. Comunque, secondo i dati dei sù citati

AA., la più elevata percentuale di germinazione è stata ottenuta con conidi incubati a temperature comprese tra 10 ° e 25 °C.

Circa l'influenza della luce artificiale sulla germinazione dei conidi, nessuna azione di rilievo è stata notata nel corso delle nostre ricerche: la minore percentuale di germinazione dei conidi esposti alla luce non ha alcun valore pratico, trattandosi di valori sempre molto alti.

Quando i conidi sono stati messi a germinare in acqua con diversi valori di acidità e di alcalinità, si nota l'85—90 % di germinazione per valori di pH compresi tra 4 e 8; a pH 3, 9, 10, il 60—70 % dei conidi germinano, mentre a pH 2 non risulta alcuna germinazione: i conidi di *G. olivarum* sono poco sensibili per variazioni di pH relativamente ampie; leggermente più sensibili sono risultati a valori bassi di pH, piuttosto che a valori elevati, carattere questo in comune a quasi tutti i funghi fitopatogeni (7).

E' stata effettuata una ricerca sull'influenza della temperatura sulla sporulazione del *G. olivarum* su Potato-dextrose agar Difco, quando le colture sono allevate alle temperature di 16 °—21 °—26 °—30 °C.

I conidi sono già presenti a distanza di 1 giorno dalla semina e la loro produzione aumenta col tempo; a distanza di 5 giorni la maggiore quantità di conidi (31 milioni per tubo di coltura) è presente nelle colture allevate a 21 °C., mentre quantità inferiori si notano a 26 °C. (11 milioni), a 16 °C. (4 milioni) e a 30 °C. (3 milioni).

Esponendo i conidi in ambiente secco su vetrini a temperature comprese tra 5 ° e 35 °C., si rileva che tali organi sopportano lungamente una temperatura oscillante intorno a 16 °C. Secondo ricerche svolte „in vitro" da ZACHOS e MAKRIS (23), i conidi possono sopportare, in condizioni naturali — insolazione e temperatura oscillante tra 8 ° e 16 °C. — una esposizione da 2 a 3 ore, senza perdere il loro potere germinativo.

I risultati conseguiti „in vitro" sono stati ampiamente confermati dai successivi studi effettuati „in vivo" su olive recise, infettate ed incubate in ambiente condizionato.

Circa l'influenza della temperatura sul processo di infezione, si è visto come operando a 10 °, 15 °, 20 °, 25 °, 30 °C., la percentuale di attecchimento del patogeno è sempre prossima al 100 %: ciò spiega il verificarsi delle infezioni in ambiente naturale da agosto (21) alla fine di dicembre (16). Circa lo sviluppo della „lebbra" l'influenza della temperatura si manifesta sulla velocità di diffusione della malattia sulle drupe: a temperature di 15 °, 20 ° e 25 °C. lo sviluppo della „lebbra" è più accelerato rispetto a quello che si verifica alle temperature di 10 ° e 30 °C. Ciò è da riferirsi alla maggiore velocità di sviluppo del micelio del patogeno a tali temperature ottimali. Secondo CABRAL (4) e ZACHOS e MAKRIS (23) l'optimum di temperatura per lo sviluppo delle colture su substrato agarizzato è compreso tra 20 ° e 25 °C. Su conidi germinati in acqua, ZACHOS e MAKRIS (23) hanno notato che il tubo germinativo è più lungo a 15 °C.; secondo le nostre osservazioni la lunghezza massima è stata raggiunta dai tubi germinativi dei conidi germinanti a 26 °C. Oltre che sulla velocità di sviluppo della „lebbra", l'influenza della temperatura si manifesta anche sul periodo di

sporificazione, periodo compreso tra l'infezione e la comparsa delle fruttificazioni del *G. olivarum*. Tale periodo è risultato più breve per le olive infette incubate a 20 ° C. (6 giorni); a 25 ° C. esso è stato di 7 giorni, a 15 °C. di 9 giorni e a 10 °C. di 23 giorni: una temperatura di 20 °—25 °C. favorisce la sporulazione del patogeno, così come è stato rilevato su substrato artificiale nel corso delle ricerche „in vitro". ZACHOS e MAKRIS (23) indicano periodi rispettivamente di poco inferiori. A 30 °C. non è stato possibile rilevare la sporulazione per le condizioni di operazione da noi adottate: l'ambiente secco ha determinato una disidratazione delle drupe. Per la sporulazione, come si è visto, non è determinante l'umidità. Tale fenomeno contribuisce a spiegare la diffusione notevole nel tempo del patogeno e l'esplosione della „lebbra" su percentuali rilevanti di drupe sulle piante attaccate.

Dalle nostre ricerche è risultato che le olive verdi non sono suscettibili all'attacco del patogeno. Ciò è stato dimostrato anche dagli studi svolti da ZACHOS e MAKRIS (23). E' stato da noi accertato che il patogeno è incapace di svilupparsi nel mesocarpo di olive immature; i due sù citati AA. hanno dimostrato, inoltre, che su agar contenente succo di olive verdi immature, il *G. olivarum* non si sviluppa: diluendo il succo con acqua distillata il patogeno si sviluppa in misura inferiore a quanto si verifica su corrispondenti substrati ottenuti con succo di olive mature, diluito nello stesso rapporto. Operando su olive verdi, raccolte in dicembre, il patogeno può insediarsi nella drupa e dar luogo alla „lebbra" (fig. 19): in questo caso si tratta di olive che hanno già raggiunto un sufficiente grado di maturazione, pur non essendo invaiate. Tali olive contengono quantità elevate di olio, per cui esse sono normalmente raccolte insieme a quelle invaiate ed utilizzate contemporaneamente. L'incapacità del *G. olivarum* ad infettare e svilupparsi nei tessuti di olive verdi immature non è dovuta alla resistenza alla penetrazione offerta dall'epicarpo di tali organi, poichè nelle nostre ricerche sono state praticate delle ferite; nè ad acidità dei tessuti del mesocarpo (che avrebbe dovuto inibire la germinazione dei conidi), poichè è stato da noi dimostrato che i conidi germinano per il 60 % in una soluzione di ac. cloridrico a pH 3; nè ad assenza di principi nutritivi nella polpa delle olive, poichè è stato accertato che il patogeno utilizza substrati artificiali ed inorganici (seminando conidi di *G. olivarum* su vetrino in una goccia di Yeast extract Difco allo 0,3 % in soluzione acquosa, dopo 3 giorni si nota un'abbondante sporulazione). A nostro avviso si tratterebbe della presenza di sostanze inibenti lo sviluppo del *G. olivarum*: secondo ZACHOS e MAKRIS, infatti, mentre il fungo non si sviluppa su succo tal quale di olive verdi immature, su substrato contenente tale succo diluito si nota un certo sviluppo, in misura maggiore, via via che si diluisce con acqua il succo e quindi le probabili sostanze inibenti.

Nel caso di olive verdi raccolte sulla pianta nel mese di dicembre, quando le drupe sono da considerarsi mature anche se non invaiate, tali sostanze non sarebbero più presenti. Attacchi di *G. olivarum* su olive verdi sono stati riscontrati da MARTELLI in Calabria in dicembre (16), mentre

GRANITI (14) ha notato in Sicilia olive verdi infettate nel mese di settembre. Non è improbabile, comunque, che esistano delle cultivar di olivo, le cui drupe siano suscettibili all'attacco del patogeno quando sono ancora verdi e immature.

Il tempo impiegato dal patogeno per penetrare nell'interno dei tessuti ed insediarsi nella sua fase parassitaria è molto breve: a 25 °C., già dopo 2 ore di permanenza delle olive a contatto con la sospensione di inoculo il 18 % delle olive risultano infettate; a 20 °C. dopo tale periodo si ha il 6 % delle olive infettate, mentre a 15 °C. il processo di penetrazione è più lento. Dalle ricerche „in vitro" si sa che il patogeno germina più rapidamente alla temperatura di 26 °C. Durante il processo di infezione è indispensabile la presenza dell'acqua, essendo stato accertato che per periodi crescenti di persistenza dell'acqua sulle drupe derivano percentuali sempre più alte di olive infette.

Perchè si realizzi l'infezione è necessario che esistano delle lesioni sull'epicarpo della drupa: nelle nostre ricerche non siamo riusciti, se non sporadicamente, a provocare l'infezione su olive integre; in quei rarissimi casi in cui l'infezione è attecchita, non si può escludere che fossero presenti delle microlesioni provocate naturalmente in campo. Nelle nostre ricerche abbiamo operato su olive delle ccv. Frantoio, Leccino e Pendolino, tutte suscettibili al patogeno nelle condizioni da noi impiegate.

Riassunto

Sono state svolte ricerche sulla biologia del *Gloeosporium olivarum* Alm., agente della „lebbra" delle olive, su conidi „in vitro" e su olive recise infettate in ambiente condizionato secondo il metodo descritto nel testo.

Allevando il patogeno su substrati agarizzati di diversa composizione, è stato accertato che il fungo si sviluppa, utilizzando sostanze minerali ed organiche. Su molti substrati la sporulazione del patogeno è favorita dalla temperatura di 21 °C. Su colture in Potato-dextrose agar Difco, incubate a diverse temperature, i conidi si formano già dopo 1 giorno dalla semina; dopo 5 giorni la sporulazione è abbondante quando le colture sono incubate a 21 °C.; essa è scarsa a 16 ° e 30 °C.

La massima percentuale di germinazione si ha: con conidi di 4 giorni di età per colture incubate a 16 ° e 21 °C.; con conidi di 3 giorni di età per colture incubate a 26 °C.; con conidi di 2 giorni di età per colture incubate a 30 °C.

Incubando per 16 ore i conidi del patogeno in acqua su vetrino, a temperature comprese tra 5 ° e 35 °C., la massima percentuale di germinazione è stata rilevata a 26 °C.; valori elevati sono stati raggiunti dai conidi incubati a temperature comprese tra 10 ° e 30 °C. A 35 °C., si verifica la germinazione soltanto dei conidi raccolti da colture allevate a 26 ° e 30 °C.; quelli invece prodotti a temperature inferiori sono soggetti a disfacimento.

La germinazione è rapida a 26 °C., lenta a 10 °C.: nel primo caso, 4 ore e mezza dopo la semina, germinano il 50 % dei conidi. La luce artificiale deprime leggermente la percentuale di germinazione; i conidi germinano normalmente quando messi in soluzione acquosa a pH compresi tra 3 e 10. I conidi esposti in ambiente secco su vetrino presentano una maggiore resistenza a 16 °C.

Su olive mature recise l'infezione si verifica, operando alle temperature comprese tra 10 ° e 30 °C., per percentuali di 75—100; sulle olive incubate dopo l'infezione, alle suddette temperature, si sviluppano sintomi di „lebbra". Gli acervuli erompono dall'epicarpo a distanza di 6, 7, 9 e 23 giorni dall'inoculazione, su olive incubate rispettivamente a 20 °, 25 °, 15 ° e 10 °C., le fruttificazioni non si notano sulle olive incubate a 30 °C.

Mantenendo dopo l'inoculazione le olive a temperature di 20 ° e 25 °C. il processo di infezione ha inizio già dopo 2 ore; a 15 °C. dopo 4 ore. La percentuale di attecchimento del patogeno è in diretta relazione con la durata del contatto delle olive con la sospensione acquosa dell'inoculo. L'infezione e lo sviluppo della „lebbra" non si verificano sulle olive verdi raccolte in agosto e settembre, si infettano invece le olive verdi raccolte dalla pianta nel mese di dicembre. La presenza di microlesioni sull'epicarpo è indispensabile per l'attecchimento del patogeno sulle drupe.

Summary

Researches on the biology of *Gloeosporium olivarum* Alm., the causal agent of "anthracnose" of olives fruit, have been made, by means of experiments "in vitro" and on collected fruits infected in conditioned room.

The culture of the pathogen on media of different composition has demonstrated that the fungus utilizes both organic and inorganic matter. The sporulation of the fungus depends on the temperature of incubation.

On culture tubes of Potato dextrose agar Difco incubated at temperatures from 16 °C. to 30 °C. the conidia are present 1 day after the inoculation; the maximum spore yield is obtained 5 days after incubating the cultures at 21 °C., the minimum at 16 °C. and 30 °C.

The conidia show the maximum percentage of germination when washed off after four days incubation from cultures kept at 16 °C. and 21 °C., after three days at 26 °C., and after two days at 30 °C.

After sixteen hours incubation of the conidia on microscope slides, high germination can occur between 10 ° and 30 °C., with a maximum above 26 °C.; with an air temperature of 35 °C. only 10 % of conidia germinate, when washed off from cultures at 26 ° and 30 °C.; after the same period of incubation at 35 °C. lysis of 100 % of conidia washed off from cultures at 16 ° and 21 °C. was observed.

The speed of germination is rapid at 26 °C., slow at 10 °C.: at the former temperature, after 4½ hours 50 % of conidia were germinated.

Artificial light slightly depresses the percentage of germination; the conidia are indifferent to the hydrogen-ion concentration of water droplets between pH 3 and 10.

When the dry conidia were exposed to temperature of 16 ° C. for 5 hours, the 50 % of germination was observed.

On collected ripe olive fruits infected between 10 ° and 30 °C. the intensity of infection was 75 to 100 %.

At these temperatures the symptoms of "anthracnose" develop on the infected olives. The eruption of the acervuli of the pathogen occurs 6, 7, 9 and 23 days after the contamination of fruit incubated respectively at 20 °, 25 °, 15 ° and 10 °C.; at 30 °C. this phenomenon does not occur.

At 20 ° and 25 °C. the process of infection begins 2 hours after the contamination; at 15 °C. after 4 hours. The intensity of infection (as percentage of fruit diseased) is correlated to the time during which the fruit was kept wet.

On the unripe fruits harvested in August and September the infection and the development of the "anthracnose" do not occur; on unripe fruits harvested in December the disase develops. The lesions on the epicarp are necessary for the occurrence of the infection.

Zusammenfassung

Laborversuche wurden über die Biologie des *Gloeosporium olivarum* Alm., des Erregers der „Lebbra" der Oliven, „in vitro" über Konidien und „in vivo" über künstlich infizierte, gepflückte Oliven ausgeführt. Durch Kultivierung des Pilzes auf verschiedenen Nährsubstraten wurde festgestellt, daß er ebenso anorganische als organische Stoffe braucht.

Auf mehreren Medien wurde die Sporulation bei einer Temperatur von 21 °C begünstigt. Kulturen auf Potato Dextrose Agar Difco wurden bei verschiedenen Temperaturen gehalten; bei allen erprobten Temperaturen bildeten sich die Konidien schon nach einem Inkubationstag; nach 5 Tagen war die Sporulation bei 21 ° reichlich, bei 16 ° und 30 ° gering.

Der höchste Keimungsprozentsatz wurde wie folgend erlangt:

a) für 4 Tage alte Konidien aus Kulturen, die bei 16 ° und 21 °C gehalten wurden;

b) für 3 Tage alte Konidien aus Kulturen, die bei 26 °C gehalten wurden;

c) für 2 Tage alte Konidien aus Kulturen, die bei 30 °C gehalten wurden.

Durch Inkubation der Konidien 16 Stunden lang im Wasser auf Objektträgern bei Temperaturen von 5 ° bis 35 °C wurde der höchste Keimungsprozentsatz für die bei 26 ° gehaltenen Konidien festgestellt. Hohe Werte wurden mit bei Temperaturen von 10 ° bis 30 ° inkubierten Konidien erlangt. Bei 35 °C keimten nur die Konidien aus Kulturen, welche bei

26 ° und 30 ° gehalten worden waren. Die bei niedrigen Temperaturen gebildeten Konidien waren einer Auflösung unterstellt.

Die Keimung war bei 26 ° schnell, bei 10 ° langsam; im ersten Falle keimten 50 % der Konidien binnen 4½ Stunden. Die künstliche Beleuchtung hemmte den Keimungsprozentsatz leicht. Die Konidien keimten in Wasser bei pH-Werten von 3 bis 10 regelmäßig. Wenn sie auf Objektträgern in trockenen Bedingungen gehalten wurden, zeigten jene bei 16 ° den höchsten Widerstand.

Bei allen erprobten Temperaturen von 10 ° bis 30 ° erlangt man einen Ansteckungsprozentsatz von 75 bis 100 auf gepflückten Oliven: bei solchen Temperaturen entwickelten sich Symptome von „lebbra" auf allen befallenen Oliven. Die Konidienlager (Acervuli) brachen vom Epikarp 6, 7, 9 und 23 Tage nach der Inokulation hervor bzw. auf inkubierten Oliven bei 20 °, 25 °, 15 ° und 10 °. Man konnte die Fruktifikationsorgane auf Oliven, welche bei 30 ° gehalten wurden, nie beobachten.

Wenn die Oliven während der Infektion bei 20 ° und 25 ° gehalten wurden, begann der Prozeß schon nach 2 Stunden, bei 15 ° nach 4 Stunden. Der Ansteckungsprozentsatz des Erregers stand in gerader Beziehung zu der Berührungsdauer der Oliven mit der wässerigen Suspension des Impfstoffes. Infektion und Entwicklung der Krankheit zeigten sich nicht auf im August und September geernteten grünen, unreifen Oliven; die im Dezember geernteten grünen Oliven wurden dagegen befallen. Für die Anwesenheit von Mikroläsionen auf dem Epikarp der Steinfrüchte war die Ansteckung durch den Erreger unbedingt notwendig.

Citazioni bibliografiche

1. Anonimo, 1956: Annuario dell'Agricoltura italiana. Istituto Nazionale di Economia Agraria, **IX**, p. 72 (1955).
2. Biraghi, A., 1934: Sul significato biologico dei presunti „appressori" nel gen. *Gloeosporium*. Boll. Staz. Pat. veg. Roma **XIV**, 202—210.
3. — —, 1934: Variazioni in due ceppi di „*Gloeosporium olivarum*" Alm. di provenienze diverse. Boll. Staz. Pat. veg. Roma **XIV**, 223—251.
4. Cabral, R. V. de G., 1941: Nota sobre o „*Gloeosporium olivarum*" Alm. Agron. Lusit. **3**, Tomo I, 49—59.
5. Ciccarone, A., 1950: Considerazioni biologiche e sistematiche sull'agente della „lebbra" delle olive, recentemente osservata nel Leccese. Boll. Staz. Pat. veg. Roma **5. III, 5**, 43—165.
6. — —, 1957: Anthracnose Fungi of olives. Nature **179**, 828.
7. Gäumann, E., 1950: Principles of plant infection. Crosby Locwood & Son. London, pp. 29—35.
8. Gorter, G. J. M. A., 1956: Anthracnose Fungi of olives. Nature **178**, 1129—1130.
9. Graniti, A., 1954: La lotta contra la „lebbra" delle olive. L'Italia Agric. **91**, 945—948.
10. — —, 1954: Una nuova malattia dell'olivio in Sicilia: la „lebbra" o „gloeosporiosi". Tecnica Agricola **3—4**, 1—4.

11. — —, 1954: La „lebbra" delle olive in Sicilia. Olivicoltura **IX**, 5, 1—5.

12. — —, 1955: Il problema della difesa dell'olivo nelle aree meridionali invase dalla „lebbra" e dalla „mosca". Orientamenti per una futura sperimentazione. Notiz. Mal. Piante **31—32 (N. S. 10—11)**, 175—180.

13. — —, 1956: Un biennio di sperimentazione in Sicilia sulla difesa dell'olivo dalla „lebbra" e dalla „Mosca". Notiz. Mal. Piante **37—38 (N. S. 16—17)**, 201—206.

14. — —, 1956: Prove di lotta contro la „lebbra" delle olive In Sicilia con calendari misti, utili anche contro la Mosca olearia **7—8**, 1—15.

15. Hemmi, T., and S. Kurata, 1935: Contributions to the knowledge of anthracnose of plants II. On *Gloeosporium olivarum* Alm. causing the olive anthracnose. J. Soc. Trop. Agric. Taiwan, **VI**, 3, 573—583: rec. sec. R. A. M. **XIV**, 596, 1935.

16. Martelli, G., 1959: La lebbra delle olive. Presenza e diffusione in Calabria. L'Italia Agric. **96**, 905—914.

17. McCallan, S. E. A., and F. Wilcoxon, 1939: An analysis of factors causing variation in spore germination tests of fungicides. I. Methods of obtaining spores. Contrib. Boyce Thompson Just. **11**, 5—20.

18. Nagorny, P. I., and E. M. Eristavi, 1929: A brief survey of plant diseases in Abkhasia in 1928. Publ. Agric. Exper. Stat. of Abkhasia **38**, pp. 28: rec. sec. R. A. M. **IX**, 226—227, 1930.

19. Saponaro, A., 1953: Presenza di *Gloeosporium olivarum* Alm. sugli organi vegetativi dell'olivo nel Leccese e nel Brindisino. Ann. Sperim. Agr. n. s. **7**, 609—619.

20. Sibilia, C., 1953: I parassiti vegetali dell'olivo e loro lotta. Olivicoltura **VII**, 4, 1—6.

21. Viennot Bourgin, G., 1949: Les champignons parasites des plantes cultivées. Masson & Cie., Paris, Tome II, pp. 1361—1362.

22. Whiffen, A. J., 1950: The activity in vitro of cycloheximide (acti-dione) against fungi pathogenic to plants. Mycologia **42**, 253—258.

23. Zachos, D. G., et S. A. Makris, 1959: Recherches sur le *Gloeosporium olivarum* Alm. en Grèce. 9. Biologia du champignon. Ann. Inst. Phytopath. Benaki **N. S. 2**, 24—42.

Aus dem Phytopathologischen Institut der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Direktor: Prof. Dr. M. Klinkowski

Über das Vorkommen von *Cryptosporiopsis corticola* (Edg.) Nannf. auf der Rinde von Apfel und Birne

Von

H. J. Müller

Mit 3 Abbildungen

Im Frühjahr 1957 wurden in Bernburg (Saale) am Kernobst (Apfel, Birne) umfangreiche Rindennekrosen beobachtet. Das bräunlich verfärbte Gewebe war gegenüber dem gesunden schwach eingesunken und trat vorwiegend auf den südlich exponierten Stammflächen auf (Abb. 1 a).

Abb. 1. Rindennekrosen an Apfel (etwa 1/3 natürl. Größe). a) Aufnahme im April 1957, Acervuli von *Cryptosporiopsis corticola* (Edg.) Nannf. auf der nekrotisierten Rinde; b) der gleiche Stamm im Juli 1958

Querschnitte durch das Rindengewebe zeigten eine 1 bis 2 mm starke periphere Zerstörung der Zellschichten des Bastkörpers. Selten war mit einer gleichzeitigen Nekrose der gesamten Rinde die „Umgürtung" des Stammes verbunden. Bäume mit derartigen Symptomen überdauerten nicht die Vegetationsperiode. Diese Schadbilder konnten im Frühjahr 1957 in verschiedenen Obstanlagen in Thüringen, Sachsen-Anhalt und in der Altmark festgestellt werden. Halb- und Hochstamm zeigten in gleicher Weise die Symptome wie Busch-, Spalier- und Cordon-Obst. Die Oberfläche der nekrotischen Rindenpartien war von zahlreichen kraterförmigen Öffnungen der Konidienlager (Acervuli) von *Cryptosporiopsis corticola* (Edg.) Nannf. durchbrochen (Abb. 2 a). Die ellipsoiden, meist ein-, selten zweizelligen Sporen, deren Plasma zunächst hyalin, später deutlich granuliert war, entstanden einzeln auf kurzen Trägern. Bei hoher Luftfeuchtigkeit wurden sie in großer Menge als gelblichweiße Schleimpfropfen aus der Öffnung der Acervuli herausgepreßt. Die Größe der Sporen verschiedener Herkünfte ist aus der Tabelle ersichtlich.

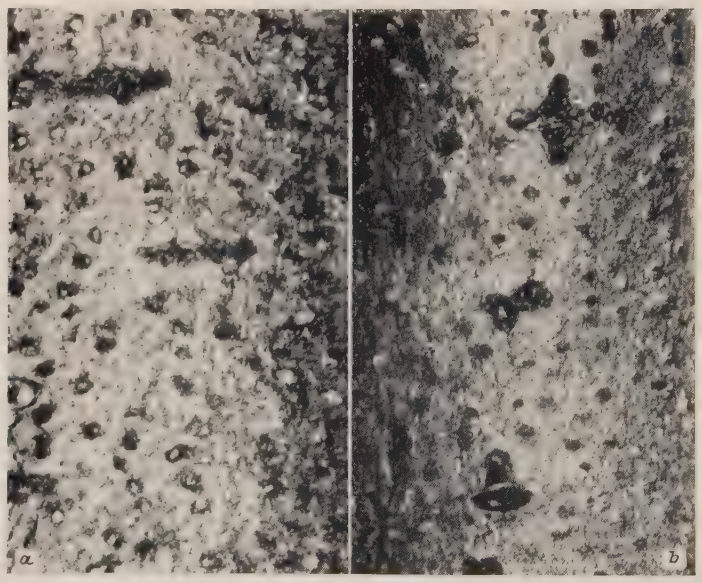


Abb. 2. a) Acervuli von *Cryptosporiopsis corticola* auf der Rinde von Apfel (6×); b) Pyknidien von *Cytospora* spec. auf Apfel (6×) — (beide Aufnahmen im April 1957)

Offensichtlich bestand eine Substratspezifität: die auf Birne gebildeten Sporen unterschieden sich in ihren Maßen deutlich von den auf Apfel entstandenen (Abb. 3).

Die Perfektform des Pilzes, *Pezicula corticola* (Jørg.) Nannf. konnte in keinem Jahr nachgewiesen werden.

An Hand von Infektionsversuchen, die mit Sporensuspensionen und krankem Rindengewebe an gesunden Apfelhochstämmen der Sorten „Ontario" und „Cox Orangen Renette" durchgeführt wurden, sollte geprüft wer-

den, ob die mitteldeutschen Herkünfte von *C. corticola* gesundes Rindengewebe nekrotisieren. Keine der künstlichen Infektionen führte zu Rindenschäden, auch Fruchtinfektionen an den Sorten „James Grieve", „Ontario", „Cox Orangen Renette" und „Schöner von Boskoop" blieben erfolglos. Es darf daraus geschlossen werden, daß die mitteldeutschen Herkünfte des Pilzes gesundes Gewebe nicht schädigen.

Tabelle

Größe der Sporen von *Cryptosporiopsis corticola* in µ*)

Herkunft	Wirtsart	Durchschnittswerte	Extremwerte
Gu 11	Apfel	26,0 × 6,9	18,4 — 29,9 × 5,8 — 6,9
Sch 21	„	21,9 × 6,8	18,4 — 27,6 × 5,3 — 8,1
Sch 23	„	21,2 × 6,9	18,4 — 25,3 × 5,8 — 9.2
Sch 25	„	24,8 × 6,7	18,4 — 32,2 × 5,8 — 8,1
B 35	„	21,9 × 7,0	16,0 — 30,0 × 5,0 — 8,0
Gu 9	Birne	26,4 × 10,4	20,7 — 34,0 × 7,0 — 14,0
Sch 25	„	26,6 × 10,4	20,0 — 34,5 × 7,0 — 12,0

*) Entspricht dem Mittel aus 100 Messungen je Herkunft.

Cryptosporiopsis corticola (Edg.) Nannf. (= *Myxosporium corticola* Edg.) ist in mehreren europäischen Ländern auf Apfel oder Birne festgestellt worden: England (Cotton 1923, Gilchrist 1923), Dänemark (Jørgensen 1930 a und b, Johannsen 1949), Frankreich (Arnaud 1923, Marchal und Foex 1927, Favard 1947), Belgien (Marchal 1939), Holland (Boerema und Gremmen 1959), Rumänien (Săvulescu und Sandu-Ville 1935). Aus anderen Kontinenten liegen u. a. Meldungen aus den Vereinigten Staaten (Edger-

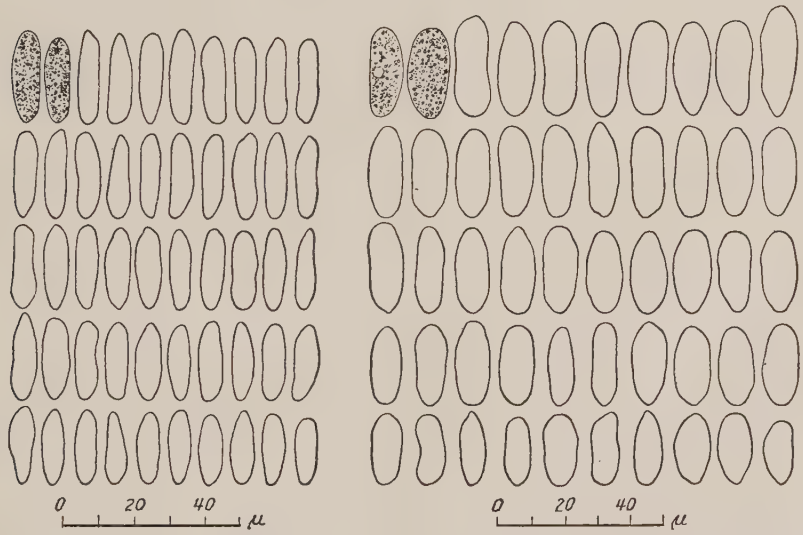


Abb. 3. Sporen von *Cryptosporiopsis corticola*. Links: Herkunft B 22 von Apfel, rechts: Herkunft Gu 9 von Birne

ton 1908, Zeller 1924, Martin 1927), Chile (Mujica 1943, Anonym 1945, Castillo 1951), Süd-Rhodesien (Hopkins 1946) und Tasmanien (Nicholls 1924) vor. Über das Auftreten des Pilzes in Deutschland konnte keine Mitteilung gefunden werden. Es soll deshalb an dieser Stelle über das umfangreiche Auftreten des Pilzes und dessen Ursachen berichtet werden.

Herr Dr. J. A. von Arx (Holland) hat Proben unseres Materials als *Myxosporium corticola* Edg. bestimmt. Wenn hier der Pilz unter dem Synonym *Cryptosporiopsis corticola* (Edg.) Nannf. erscheint, so auf Grund der Arbeit von Boerema und Gremmen (1959)[1]).

Bezüglich Systematik und Synonymie des Pilzes sei auf die Arbeiten von Wakefield und Moore (1936), Wollenweber (1939) und Boerema und Gremmen (1959) verwiesen. Das sich in den eigenen Untersuchungen immer wieder bietende Krankheitsbild entspricht den Beschreibungen anderer Autoren; besonders zutreffend ist die Bezeichnung „superficial canker" (Zeller 1924, Jørgensen 1930 a). Vom Tage der ersten Beobachtung an (Frühjahr 1957) bis zum Herbst 1959 erfolgte keine weitere Ausdehnung der Rindennekrosen. Das geschädigte Gewebe wurde im Laufe der Vegetationsperioden 1957 und 1958 abgestoßen (Abb. 1 a und b). Dieser Prozeß begann am Rande der verbräunten Rindenpartien, später traten auch auf deren Fläche Risse auf. In der Regel wurde das abgestorbene Gewebe durch gesundes Korkgewebe ersetzt.

Da Wundinfektionen an gesunder Rinde zu keinen Absterbeerscheinungen führten und auch eine Ausbreitung des Pilzes darin nicht nachzuweisen war, bestehen berechtigte Bedenken gegen eine Ausbreitung in gesunder Rinde, obwohl Jørgensen (1930 a) nach Infektion mit Pilzherkünften aus Dänemark Rindennekrosen erhielt. Der deutsche Obstbau hatte zur Zeit der eigenen Untersuchungen stark unter den Nachwirkungen der Fröste des Winters 1956 zu leiden (siehe auch Masurat und Stephan 1958). Die Frostschäden wurden zum Teil erst im Frühjahr 1957 sichtbar. Eine Auswertung meteorologischer Daten bestätigte auch für das mitteldeutsche Untersuchungsgebiet einen starken Kälteeinbruch im Februar 1956, in dessen Verlauf es besonders an der Südseite der Obstgehölze zu partiellen Erfrierungen kam[2]). Alle Beobachtungen sprechen dafür, daß sich in den untersuchten Gebieten *C. corticola* erst sekundär auf dem frostgeschädigten Gewebe angesiedelt hat. Marchal (1939) und Boerema und Gremmen (1959) äußerten sich in demselben Sinne, indem sie für die Besiedelung der Rinde durch den Pilz eine Frostschädigung voraussetzten.

Auf den Rindennekrosen von etwa 1000 Bäumen, die dauernd unter Kontrolle gestanden haben, wurden neben *Cryptosporiopsis corticola* häufig Pyknidien von *Cytospora* spec. festgestellt. Die Sporenlager beider Pilzgattungen unterscheiden sich makroskopisch nur geringfügig und können Anlaß zu Verwechslungen sein (Abb. 2 a und b). Mikroskopisch ist aber eine

[1]) Herrn Dr. v. Arx sei an dieser Stelle für die Bestimmung des zugesandten Materials freundlichst gedankt.

[2]) Für die freundliche Einsichtnahme in die Unterlagen der meteorologischen Messungen bin ich Herrn Dr. Ragaller, Institut für Pflanzenzüchtung Bernburg, dankbar.

deutliche Trennung durch Sporenform und -größe wie auch durch das Fehlen eines geschlossenen Pyknidiums bei *Cytospora* möglich. *Cytospora* ist als Saprophyt auf abgestorbenen Rinden von Obstgehölzen bekannt (Fisher und Reeves 1931, Wöstmann 1957 u. a.).

Zusammenfassung

Es wird über das Auftreten von *Cryptosporiopsis corticola* auf Rinden von Kernobst in Mitteldeutschland berichtet. Die Nekrosen entsprechen den in der Literatur als „superficial canker" beschriebenen Symptomen. Alle Beobachtungen und Versuche sprechen dafür, daß der mitteldeutschen *Cryptosporiopsis*-Infektion im Jahre 1957 eine Frostschädigung der Rinde vorausgegangen war. Auf die Möglichkeit einer Verwechslung mit *Cytospora*-Infektionen wird hingewiesen.

Summary

The occurrence of *Cryptosporiopsis corticola* (Edg.) Nannf. on the bark of apples and pears

The occurrence of *Cryptosporiopsis corticola* on the bark of pome fruits in Central Germany is reported. The necrosis corresponds to the symptoms described in the literature as superficial canker. All observations and experiments indicate that the infection of *Cryptosporiopsis* in Central Germany in 1957 was preceded by frost damage to the bark. The possibility of a confusion with *Cytospora* infections is pointed out.

Literaturverzeichnis

Anonym, 1945: Nómina de determinaciones de enfermedades de origen parasitario efectuadas durante el año 1945 por la sección fitopatologica del departamento de sanidad vegetal, que no han sido mencionadas anteriormente para nuestro pais. Agric. tec. Chile **5**, 224.

Arnaud, G., 1923: Sur un champignon parasite des branches du poirier: le *Dermatea corticola* n. sp. Rev. path. vég. ent. agric. **10**, 303—307.

Boerema, G. H., en J. Gremmen, 1959: Een opperflakkige bastkanker bij appel en peer veroorzaakt door *Pezicula corticola*. T. Pl.ziekten **65**, 165—176.

*Castillo, C. V., 1951: Primera asamblea latinoamericana de fitoparasitologia. Foll. misc. ofic. estud. esp. Mex. **4**, 224—232.

*Cotton, A. D., 1923: Fungus diseases of crops 1920—1921. Min. agric. fisheries, misc. publ. **38**.

*Edgerton, C. W., 1908: Two little known Myxosporiums. Ann. myc. **6**, 48—53.

*Favard, P., 1947: Sur trois champignons parasites du verger. Progr. agric. vitic. **48**, 341—344.

Fisher, D. F., and E. L. Reeves, 1931: A *Cytospora* canker of apple trees. Journ. agric. res. **43**, 431—438.

Gilchrist, G., 1923: Bark canker disease of apple trees caused by *Myxosporium corticolum* Edgert. Trans. Brit. mycol. soc. **8**, 230—243.

*Hopkins, J. C. F., 1946: Annual report of the branch of plant pathology and botany for the year ending 31st dec. 1945. Rhod. agric. j. **43**, 333—343.

Johannsen, G., 1949: The Danish species of the Discomycete genus *Pezicula*. Dansk. bot. ark. **13**, 1—26.

Jørgensen, C. A., 1930 a: Barkkroeft paa aeble og poere, foraarzaget af *Neofabraea corticola* (Edgert.) S. A. J. n. sp. et n. comb. T. planteavl **36**, 800—811.

— —, 1930 b: Mykologiske notitser 3—10. Bot. tijdsskr. **41**, 227—239.

Marchal, E., 1939: Observations et reserches affectuées à la station de phytopathologie de l'état pendant l'année 1938. Bull. inst. agron. Gembloux **8**, 77—85.

— —, et E. Foex, 1927: Rapport phytopathologique pour les années 1926—27. Ann. épiphyties **13**, 383—454.

*Martin, W. H., 1927: Report of the department of plant pathology. 17. Ann. rep. New Jersey agric. exp. stat. for the year ending June 30th 1926, 313—324.

Masurat, G., und S. Stephan, 1958: Das Auftreten der wichtigsten Krankheiten und Schädlinge der landwirtschaftlichen und gärtnerischen Kulturpflanzen in den Jahren 1955 und 1956 im Bereich der DDR. Nachrbl. Dt. Pflzschutzd. Berlin NF **12**, 81—95.

Mujica, F., 1943: Hongos chilenos no mencionados anteriormente en la literatura. Bol. sanid. veg. Chile **3**, 33—35.

*Nicholls, H. M., 1924: Annual report of the government microbiologist. Tasmania agric. stock dep. rept. for 1923—24, 7—8.

Săvulescu, T., und C. Sandu-Ville, 1935: Beitrag zur Kenntnis der Micromyceten Rumäniens. Hedwigia **75**, 159—233.

Wakefield, E. M., and W. C. Moore, 1936: Notes on certain changes in nomenclature in the second edition of the list of common names of British plant diseases. Trans. brit. mycol. soc. **20**, 97—109.

Wöstmann, E., 1957: Birnbaumsterben in Westfalen. Nachrbl. Dt. Pflzschutzd. Braunschweig **9**, 25—27.

Wollenweber, H. W., 1939: Discomycetenstudien (*Pezicula* Tul. und *Ocellaria* Tul.). Arb. Biol. Reichsanst. Land- u. Forstwirtsch. **22**, 521—570.

Zeller, S. M., 1924: *Sphaeropsis malorum* and *Myxosporium corticola* on apple and pear in Oregon. Phytopathology **14**, 329—333.

* = Die Arbeiten waren nur im Referat zugänglich.

Soeben erschien:

Krankheiten und Schädlinge im Gemüsebau

und ihre Bekämpfung

Von Professor Dr. Walter Kotte
Direktor i. R. des Pflanzenschutzamtes Freiburg i. Br.

3. neubearbeitete Auflage

386 Seiten mit 160 Textabbildungen und 8 Farbtafeln.

Kartoniert DM 46,—; Ganzleinen DM 50,—

Das von Wissenschaft und Praxis hervorragend beurteilte Werk erscheint nun in seiner dritten, stark vermehrten und auf den neuesten Stand gebrachten Auflage. Sein Verfasser ist durch zahlreiche Veröffentlichungen weit über die Grenzen Deutschlands bekannt und genießt auf dem Gebiet des Pflanzenschutzes internationalen Ruf.

Allen, die Gemüse anbauen, sich mit der Bekämpfung und Behandlung von Krankheiten und Schädlingen an Gemüsepflanzen — sei es in der Praxis oder der einschlägigen Industrie — befassen oder im gemüsebaulichen Pflanzenschutz lehrend und beratend tätig sind, vermittelt das Buch die Kenntnisse, die zum Schutz der Kulturen vor Schädigungen aller Art als Grundlage dienen sollen. 160 zum Teil erneuerte und verbesserte, instruktive Abbildungen sowie 8 neu hergestellte Farbtafeln erleichtern das Verständnis des Textes. Nach dem neuesten Stand der Forschung werden behandelt: die Schmarotzerpilze, Insekten und andere Schädlinge der Gemüsepflanzen, deren Biologie ausführlich dargestellt wird, aber auch Viruskrankheiten, deren Bedeutung von Jahr zu Jahr wächst. Besonderer Wert wurde auf die Darstellung der „nichtinfektiösen Schädigungen", also der Schäden, die vorwiegend durch Kulturfehler entstehen, gelegt. Die für den gemüsebaulichen Pflanzenschutz heute zur Verfügung stehenden Geräte werden ebenfalls dargestellt. Für den, der tiefer in Einzelfragen eindringen will, ist der neuen Auflage erstmalig ein Verzeichnis neuerer Literatur beigefügt.

„Im neuen Kotte liegt nunmehr wieder ein repräsentatives Handbuch für den fortschrittlichen Gemüsebauer vor, das rückhaltlos empfohlen werden kann." *Pflanzenschutz*

„Es gibt auf dem Gebiet der Schädlingsbekämpfung kein Werk, das in so anschaulicher, dabei aber leichtverständlicher Weise die Gefahren der Schädlinge aufzeigt, gleichzeitig aber auch die Mittel und Wege aufführt, die zur Vorbeugung und Bekämpfung dienen können."

Landwirtschaftliches Jahrbuch für Bayern

VERLAG PAUL PAREY / BERLIN UND HAMBURG

Handbuch der Laubgehölze

in zwei Bänden

Von Gerd Krüssmann, Dortmund

Es liegt vor:

Band I (Lieferung 1 bis 7): 1960. 504 Seiten und 164 Kunstdrucktafelseiten mit insgesamt 684 Abbildungen im Text und auf den Tafeln.
(Subskriptionspreis) Ganzleinen DM 148,—.

Band II erscheint in etwa 7 Lieferungen in vierteljährlicher Folge. Jede Lieferung umfaßt etwa 72 Textseiten und 24 Kunstdrucktafelseiten. Der ermäßigte Subskriptionspreis je Lieferung beträgt DM 18,60. Er erlischt mit dem Erscheinen der letzten Lieferung. Mit der Schlußlieferung wird eine Einbanddecke in Ganzleinen zum Preis von DM 4,— geliefert.

Das Kernstück dieses neuen, großangelegten Handbuches über alle in Europa vorkommenden winterharten Laubgehölze — mit Ausnahme spezieller Mittelmeerflora — ist eine bis in alle Einzelheiten gehende Beschreibung. Das Schwergewicht liegt dabei auf der exakten, kurz gefaßten, aber alles Wesentliche enthaltenden Darstellung und auf den Hinweisen über die Verwendungsmöglichkeiten und Lebensansprüche der Laubgehölze. Weitere Angaben betreffen Herkunft, Winterhärte, Einführung in die gärtnerische Kultur, Abbildungsnachweise usw. Die Gehölze werden in alphabetischer Folge mit zusätzlicher Angabe der Synonyme aufgezählt. Die Nomenklatur entspricht dem neuesten Stand der internationalen Vereinbarungen.

„Die einführende Terminologie erläutert in Worten und Zeichnungen genauestens alle botanischen und technischen Begriffe, so daß jedes Mißverständnis ausgeschlossen sein sollte. Auch das Verzeichnis der botanischen Autoren und Gärtner gibt in der kurzen beschreibenden Form wertvolle Hinweise und wird bestimmt viele noch bestehende Zweifel klären helfen. Durch die vielen eindringlichen Zeichnungen und Bilder wird die Textierung auf das wertvollste unterstützt. Das Buch wird in dieser Form und Aufmachung sicherlich für den Dendrologen, den interessierten Laien und vor allem auch für den gärtnerischen Nachwuchs ein unentbehrliches Studien- und Nachschlagewerk werden. Der Name des Verfassers bürgt dafür, daß das „Handbuch der Laubgehölze" ein dendrologisches Standardwerk von bleibendem Wert wird." *Die neue Landschaft*

VERLAG PAUL PAREY / BERLIN UND HAMBURG